



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**FONTS ALTERNATIVES DE LA PROTEÏNA I LA SEVA
AL-LERGENICITAT**

Àngel Ricard Escandell Faus

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutora professional: Maria Teresa Blay Olivé, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, mteresa.blay@urv.cat

Tutor acadèmic: Gerard Pujadas Anguiano, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, gerard.pujadas@urv.cat

Juny 2023



Jo, Àngel Ricard Escandell Faus , amb DNI 47936713K, soc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 6 de Juny 2023



Índex:

1.	Dades del centre.....	4
2.	Abstract & keywords	5
3.	Introducció.....	5
3.1.	El problema mediambiental	5
3.2.	Insectes com a font de proteïna per a l'alimentació humana	6
3.2.1.	Beneficis de la ramaderia d'insectes	8
3.2.2.	Cria d'insectes per a l'alimentació animal i humana	8
3.2.3.	Contingut nutricional.....	9
3.2.4.	Al·lergenicitat.....	12
3.2.5.	<i>Tenebrio molitor</i> o escarabat de la farina.....	13
3.3.	El <i>Lupinus albus</i> o tramús com a font de proteïna alternativa a la proteïna animal	13
3.3.1.	Contingut nutricional.....	14
3.3.2.	Al·lergenicitat.....	15
3.4.	Model in vitro per a avaluar al·lergenicitat: Línia cel·lular KU812 de basòfil humà	15
3.5.	Activitat enzimàtica β -hexosaminidasa: Marcador de desgranulació KU812.	16
3.6.	Altres alternatives proteiques per a afrontar el problema de la sostenibilitat alimentària	17
4.	Hipòtesi i Objectius	19
5.	Materials i Mètodes	19
5.1	Cultiu cel·lular	19
5.2	Extractes rics en proteïna a testar	20
5.2.1	Establir controls.....	20
5.3	Assaig de blau tripà.....	21
5.3.1	Fonament.....	21
5.3.2	Material	22
5.3.3	Procediment.....	22
5.4	Activitat β -Hexosaminidasa en KU812	23
5.4.1	Fonament.....	23
5.4.2	Material	23
5.4.3	Procediments experimentals.....	23
5.4.3.1	Preparació dels reactius	23



5.4.3.2	Assaig β -Hexosaminidasa	23
5.5	Mètodes estadístics	25
5.6	Resultats.....	26
5.6.1	Resultats assaig blau tripà	26
5.6.2	Resultats β -Hexosaminidasa	28
5.7	Discussió dels resultats	29
6.	Conclusions	31
7.	Autoavaluació.....	32
8.	Agraïments	33
9.	Bibliografia.....	34
10.	Annexos.....	37
I.	Imatges	37
II.	Annex 2.....	45
III.	Taules.....	46
IV.	PNT realitzat	49
V.	Reactius de la β -hexosaminidasa	52
VI.	Mètodes estadístics aplicats	52
VII.	Conveni de pràctiques.....	¡Error! Marcador no definido.



1. Dades del centre



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MoBioFood

Aquest treball s'ha dut a terme en l'estada de pràctiques amb el grup d'investigació MoBioFood de la Universitat Rovira i Virgili.

El grup d'investigació forma part del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat de Química i d'Enologia, situat al Campus Sescelades a Tarragona (C/ Marcel·lí Domingo, 1, 43007, Tarragona, Espanya).

El seu equip està compost per sis investigadors sèniors i set estudiants de doctorat, i al seu [espai web](#) podem veure tant l'equip de manera més específica com les publicacions i l'experiència amb el que compta aquest departament de recerca.

En aquest grup d'investigació es dediquen a estudiar la bioactivitat molecular dels aliments a nivell del tracte gastrointestinal, és a dir, avaluen com diversos components de la nostra dieta poden afectar de manera adversa o beneficiosa al nostre intestí, i com aquests posteriorment afecten a la resta de la salut del organisme.

No es limiten a això, sinó que també treballen en camps derivats del mateix, com l'ús de noves tècniques o innovacions en el camp de les "biofoods", buscant noves fonts de proteïna d'alta qualitat nutricional i sostenibles mediambientalment; camp on s'ha enfocat aquest treball.

Actualment, es centren en l'estudi de la interacció de components de la dieta amb el sistema endocrí, la capacitat que tenen aquests mateixos compostos per a modificar la integritat de la barrera intestinal i l'efecte immunomodulador que tenen. També estudis sobre com afecten certs aliments a les alteracions de la microbiota intestinal i finalment com diferents compostos bioactius afecten a factors epigenètics en situacions d'estrès metabòlic



2. Abstract & keywords

With the current environmental crisis, one of the sectors that generates the most pollution and expenses is the meat industry. Nowadays, efficient alternatives are being sought to reduce the environmental footprint it leaves behind, and some of these alternatives are lupin and insect protein, which are highly effective and underexploited sources in the market due to a lack of information and studies regarding various aspects of these sources, including their potential allergenicity. This study will evaluate not only the allergenicity of these components but also seek an alternative methodology to assess it. A new biotechnological tool will be obtained, which is more effective as it is faster, simpler, and cheaper – an evaluation of released β -hexosaminidase instead of histamine, using a straightforward colorimetric method. This method is successfully applied and low allergenicity is obtained on both of the sources of interest; making a step further into developing this new tool.

Keywords: β -hexosaminidase, Immunoglobulin E, KU812 Human basophil cell line, Allergenicity, Insect protein, Lupin protein

3. Introducció

3.1. El problema mediambiental

Avui en dia ens trobem en una crisi global a molts de nivells. Una de les més importants és el canvi climàtic, que conjuntament amb una societat consumista, produeix la decadència de la naturalesa i específicament dels pols. Un dels sectors que més contribueix en aquest canvi és el dels aliments, específicament la indústria càrnica, que suposa un 14,5% total de les emissions de CO₂ a l'atmosfera, essent aquesta una xifra més alta que l'emissió de gasos donada pels transports en tot el món [1].

Una altra crisi a la qual contribueix aquest sector és a la gegantesca petjada hídrica que deixa. Aquesta és molt variada depenent de l'espècie animal, però a tots es troben quantitats més grans de les que voldríem imaginar, sobretot si es compara amb sectors de cultiu. Per a exemplificar-ho; la petjada hídrica d'una sola caloría de vedella és 20 vegades més gran que la d'un cultiu de cereal (Taula 9) [1].

A arrel d'aquest problema en específic, alguns científics han posat el seu gra de sorra amb investigacions per a reduir el consum d'aigua de diverses; com per exemple analitzant el consum i necessitats regions diferenciades i donant una teòrica solució de com millorar l'actual ineficiència del balanç entre consum i producció d'aigua dolça [2].

La població, cada cop més conscient d'aquestes emissions tant notables per part de la indústria, posa també en qüestió la moralitat del tracte dels animals en aquestes empreses. Conseqüentment, ha portat a la recerca d'un substitut de la carn com a font de proteïna sustentable.



Aquí és on entren en joc els grups de recerca científica, que s'han dedicat a experimentar per a trobar diverses solucions.

3.2. Insectes com a font de proteïna per a l'alimentació humana

Una de les alternatives més destacades és la proteïna d'insecte. Aquesta es presenta com a l'alternativa a productes càrnics o proteics amb més potencial i eficiència, i és un camp en el qual s'ha començat a treballar molt en els últims anys [3].

Per a exemplificar això, si fem una ràpida recerca al *PubMed* i introduïm els termes clau, veurem com els resultats d'articles/any ha anat creixent exponencialment conforme ens hem vist amb la necessitat d'aturar aquesta crisi a nivell global.

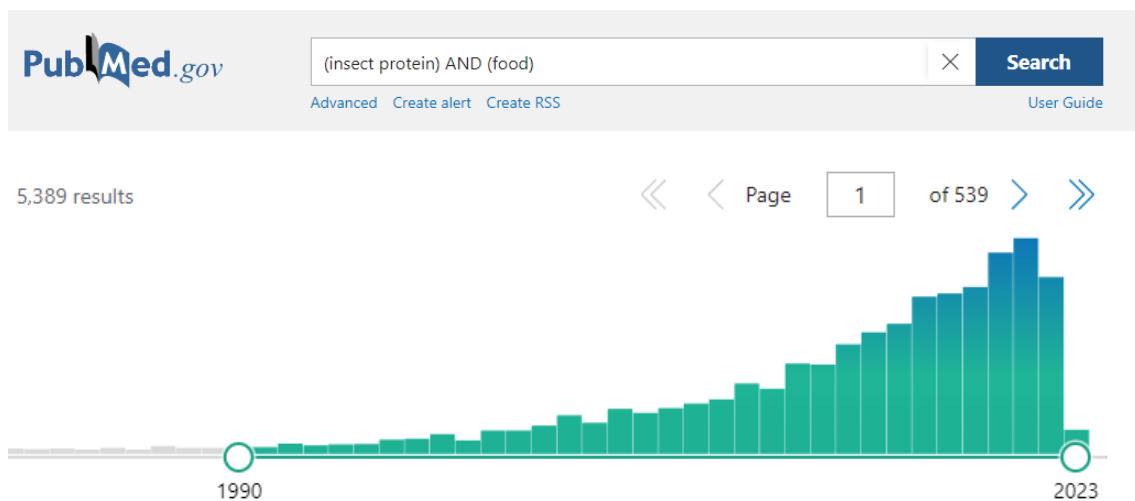


Figura 1: Quantitat d'articles/any fets relacionats amb els insectes com a nova font de proteïna/menjar per als humans, essent el pic al 2021 amb un total de 598 articles. Font: PubMed.

Actualment, unes 1900 espècies d'insectes són consumides sobretot a països tropicals, tendència la qual no es promociona pels seus propis governs que intenten emular la dieta occidental. En els països occidentals, la consumició d'insectes està vista com a culturalment inadequada per diverses raons, entre elles, l'associació d'aquests a malalties i brutícia[4].

Tot i això i tenint en consideració el constant creixement de la població humana i el decreixement dels recursos, requerirà que la humanitat canvi molts dels seus hàbits còmodes; entre aquests els alimentaris i més concretament relacionats amb la consumició de carn. S'ha estudiat si és realment apropiat començar a considerar els insectes com una alternativa sostenible que pugui ajudar en aquesta crisi global alhora que sigui completament segura i assequible a nivell de recursos[5].

Es suggereix que l'agricultura i el benestar humà serà greument afectat (per si actualment no fos ja greu) pel canvi climàtic i ens dona una idea a nivell percentual



d'alguns canvis que es donaran en canvis de preus, en regions més afectades com el sud d'Àsia, la disponibilitat de calories i molts altres al 2050, on s'està previst que la població mundial arribi als 9 bilions. Específicament en aquest cas, observarem el canvi que suposarà a nivell de cultius, el qual amb aquest mapa teòric comparatiu de temperatures, ens podem fer una millor idea [6].

Aquesta afectació a l'agricultura portarà al increment de preus dels cultius més importants el qual a la vegada comportarà una pujada de preus de tots els tipus de carn que representarà més del 30% en comparació a l'actualitat (Figura 3). Tot això només tenint en compte aquest factor, encara que el mateix article també esmenta que la situació total pot ser encara més greu per altres factors, causant que els preus pugin un addicional 18-21% [6].

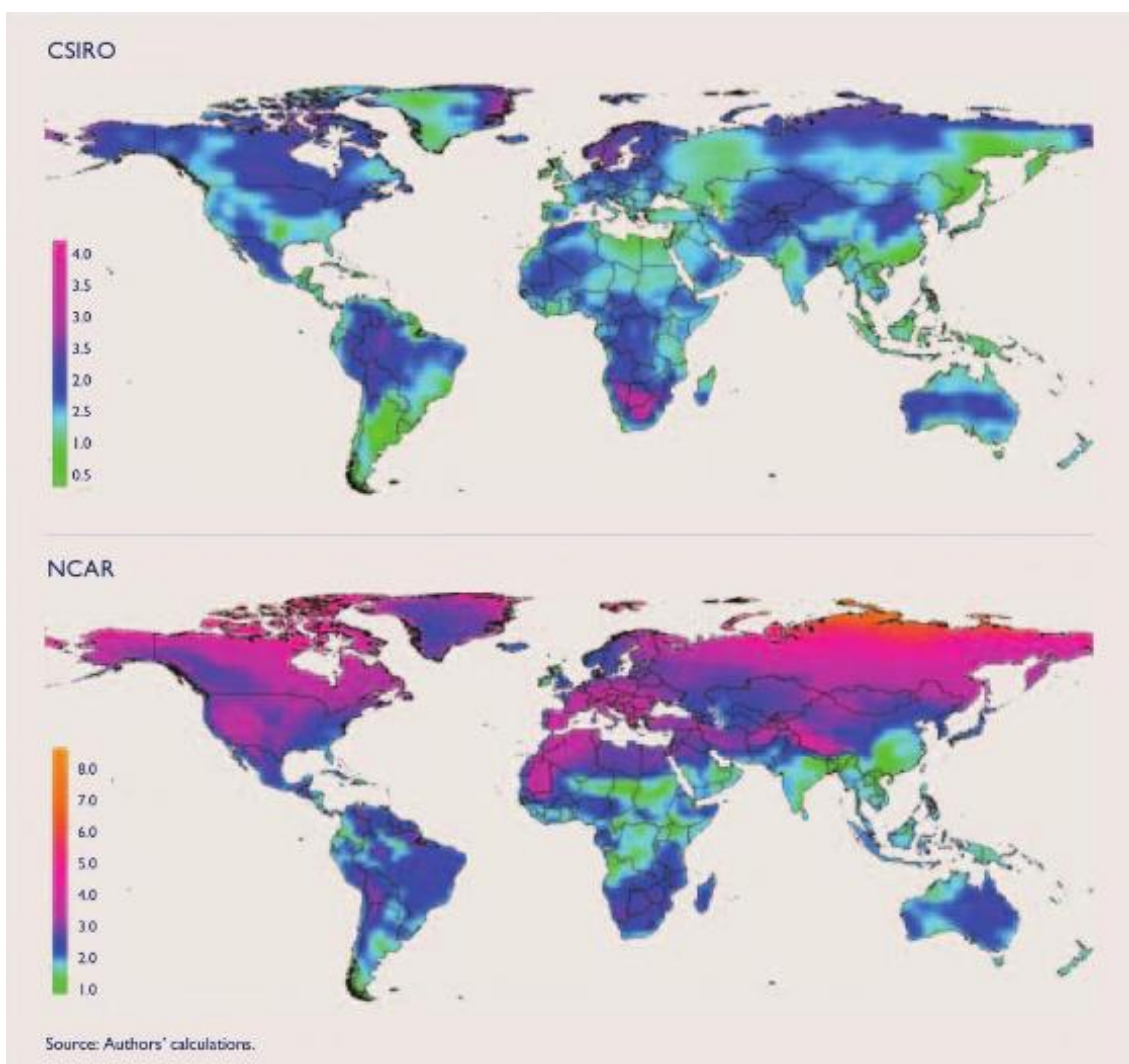


Figura 2: Canvi de temperatures mitjanes arreu del món de l'actualitat al 2050[6].



3.2.1. Beneficis de la ramaderia d'insectes

Els beneficis de la ramaderia d'insectes, també anomenada *mini-livestock*, són diversos. Entre aquests es troba la poca producció de gasos d'efecte hivernacle i d'amoní en comparació a la ramaderia convencional.

Un altre benefici que val la pena mencionar és la taxa de conversió d'aliment, que és una taxa que mesura l'eficiència en la qual els cossos del *livestock* es converteix en menjar desitjat. No només tenen un rati amb un valor més petit i per tant més favorable, sinó que al mateix apartat ens ensenyen i comparen el % de proporció comestible d'animals en comparació a un grill i podem observar que aquest últim té un % molt major i per tant, més eficient (Taula 1).

	Cricket	Poultry (135)	Pork (135)	Beef (135)
Feed conversion ratio (kilogram feed:kilogram liveweight)	1.7 (31)	2.5	5	10
Edible portion (%)	80 (101)	55	55	40

Taula 1: Taula extreta del estudi on veiem una comparativa de la taxa de conversió de l'aliment i % comestible de diferents ramats [5].

En quant a l'ús de l'aigua, s'espera que sigui significativament menor que l'ús per al *livestock* convencional, el qual es compara amb la carn de vaca, que requereix uns 22.000 litres/kg produït, i molts estudis n'estimen uns 43.000 litres/kg per aigua utilitzada de manera indirecta per a fer créixer a l'animal [5].

3.2.2. Criada d'insectes per a l'alimentació animal i humana

Hi ha alguns pocs insectes que porten essent cultivats pels humans pels subproductes que generaven. Uns clars exemples d'això en són els cucs de seda, les abelles de la mel o les cotxinilles, molt utilitzada en la indústria dels additius per generar l'E120, que es tracta d'un colorant alimentari vermell [7].

En quant a la resta, la majoria dels insectes comestibles s'ha trobat sempre de forma natural o cultivats de forma indirecta. Aquests eren àmpliament consumits en països com Tailàndia, Xina i Sudamèrica de fa molts anys. No ha sigut, però fins fa pocs anys, on s'han començat a cultivar comercialment insectes per al consum humà i més recentment s'ha començat a introduir a Europa i Espanya. Alguns exemples en serien el *Rhynchophorus ferrugineus*, *Lethocerus indicus* i els escarabats aquàtics. Tot i això, no hi ha cap classe de producció a gran escala per a consum humà, i per tant, no poden ser promocionats en aliments fins que aquesta producció es desenvolupi. Per ara, roman com una feina per a indústries especialitzades en la cria i esterilització d'insectes per a la síntesi de pinsos per a mascotes [8].

Per tant, els principals problemes per a resoldre d'una teòrica criada massiva, controlada i estèril d'insectes són la qualitat, fiabilitat i rendibilitat que donarien. Cal tenir en



consideració altres problemes com l'aparició de patògens causants de zoonosis o els continguts de metalls pesants [9].

Tot i això, ho podem comparar de manera positiva amb els productes proteics convencionals donats per l'alimentació animal, ja que és teòricament fàcil produir insectes en massa utilitzant mètodes industrials[10].

3.2.3. Contingut nutricional

Gràcies al impacte que ja ha tingut aquest tema., s'han publicat molts articles que investiguen precisament el valor nutricional d'espècies d'insecte diferents. Fins avui s'han reportat i caracteritzat més de 1900 espècies, sent un nombre tant gran que no es pot donar una generalització dels seus components nutricionals.

La qualitat proteica per a humans és mesurada amb perfils d'aminoàcids i digestibilitat, i les espècies més consumides (com ara *Imbrasia belina*, *Rhynchophorus phoenicis*, *Oryctes rhinoceros*, *Macrotermes bellicosus*) han mostrat contenir tots els aminoàcids essencials, i quantitats relativament elevades de lisina i metionina; dos aminoàcids més limitants en dietes basades en llegums [11].

El seu contingut en greixos també es molt variable, amb algunes espècies destacant més que altres, el que si destaca és el seu rati comparatiu entre greixos saturats/insaturats, que és menys del 40% i es compara favorablement amb el perfil dels peixos.

Un altre punt molt favorable i poc destacat en els insectes és el seu contingut en micronutrients, com ara ferro i zinc, sabent que almenys 3 bilions de persones pateixen alguna de les dues deficiències arreu del món [11].

Per últim, cal mencionar la importància que tenen en l'aport de quitina. Aquest és el principal component de l'exoesquelet dels artròpodes. Atrau molt l'atenció degut a la seva recent descoberta activitat biològica, on destaca una millora de l'efecte immune, promoure el creixement de bacteries beneficioses i inhibint el creixement de patògens [12], [13].

Podem comprovar que la quantitat de proteïna que es pot extreure de les espècies d'insecte es comparable a la de la carn convencional en termes de quantificació proteica (Taula 2) [11].

Insects	Moisture (%)	Fat (%)	Crude protein (%) (including chitin nitrogen)	Other components (%) (e.g. carbohydrates, minerals and vitamins)
<i>T. molitor</i>	63.5 ± 1.8	9.9 ± 1.0	19.1 ± 1.3	7.5 ± 2.2
<i>A. diaperinus</i>	64.5 ± 1.0	8.5 ± 0.2	20.6 ± 0.1	6.4 ± 1.0
<i>Z. morio</i>	59.9 ± 5.4	16.0 ± 0.7	20.7 ± 0.3	3.4 ± 5.5
<i>A. domesticus</i>	70.8 ± 2.0	3.6 ± 0.4	21.5 ± 0.5	4.1 ± 2.1
<i>B. dubia</i>	67.4 ± 2.1	7.7 ± 0.1	19.3 ± 0.9	5.6 ± 2.3

Taula 2: Taula amb la composició de 5 tipus d'insecte en base al seu pes [11].



En termes de contingut proteic, la comparació entre la carn i els insectes és més que interessant. Segons l'estudi esmentat, la carn de vedella conté aproximadament un 21% de proteïnes en pes sec, mentre que la carn de pollastre té un 25%. D'altra banda, els grills contenen un 69% de proteïna en pes sec i les larves d'escarabat tenen un 53%, veient nombres molt majors a primera vista (Taula 3).

Unit (mg/g crude protein)	<i>A. diaperinus</i>	<i>T. molitor</i>	<i>Z. morio</i>	<i>A. domesticus</i>	<i>B. dubia</i>	Casein	Soybean
<i>Essential amino acid (EAA)</i>							
Histidine	34	29	31	21	23	32	25
Isoleucine	43	43	46	36	31	54	47
Leucine	66	73	71	66	56	95	85
Lysine	61	54	54	53	43	85	63
Methionine + Cysteine	26	26	24	25	23	35	24
Phenyl-alanine + tyrosine	120	100	111	92	93	111	97
Threonine	39	39	40	35	32	42	38
Tryptophan	12	12	14	9	8	14	11
Valine	58	61	63	55	52	63	49
Sum of EAA	459	437	454	392	361	531	439
<i>Non-essential amino acid</i>							
Alanine	66	70	68	81	71		
Arginine	54	54	54	65	46		
Aspartic acid	83	80	82	73	67		
Glutamic acid	123	109	127	110	96		
Glycine	46	50	48	51	53		
Proline	56	66	56	54	48		
Serine	40	44	42	38	34		
Sum of total AA	927	910	931	864	776		
EAAI	1.65	1.60	1.66	1.39	1.28	1.93	1.56

Taula 3: Patró d'aminoàcids de les 5 espècies d'insecte, caseïna i de la soja [11].

Aquests números suggereixen que els insectes comestibles poden ser una font de proteïna més concentrada que la carn convencional. En particular, els grills i les larves d'escarabat semblen tenir un contingut proteic excepcionalment alt.

A més a més, els insectes també contenen altres nutrients importants, com ara greixos saludables, vitamines i minerals.

Les larves de *Tenebrio molitor*, per exemple, tenen un contingut proteic del 50% en pes sec, el que les converteix en una font excel·lent de proteïnes. A més a més, també contenen greixos saludables, com ara àcids grassos omega-3 i omega-6, així com altres nutrients importants, com ara vitamines i minerals [14].



Basic Nutrients Species	Energy (kcal/100 g)	Protein (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Fiber (g/100 g)	Cholesterol (mg/100 g)	INQ Values for Protein *
<i>Acheta domesticus</i> A [28,29,44]	153	20.5	5.06	4.6	98.5	6.73
<i>Acheta domesticus</i> L [30,43,44,45]	137.5	15.4–17.5	4.4–7.9	2.3	-	6.13
<i>Gryllus bimaculatus</i> A [5,35,36]	120	15.75	5.5–5.75	3.4	195	6.72
<i>Tenebrio molitor</i> A [5,30,45]	178	24.13	6.14	7.4	-	6.94
<i>Tenebrio molitor</i> L [29,43,45,46]	247	25.0	12.91	3.52	51.3	5.18
<i>Zophobas morio</i> L [43]	206.9	18.6	14.4	3.78	45	4.60
<i>Gonimbrasia belina</i> L [28,35]	161	35.2	15.2	-	-	11.20
<i>Bombyx mori</i> L [5,35,45]	171.27–229	17.9–23.1	4.26–5.0	1.0–22.22	-	5.72
<i>Pyralidae</i> L [35,43,44,45]	274.7	16.1	24.9	2.1–3.4	75.3	3.00
Mutton leg	196.56	15.12	15.12	-	65.52	3.94
Veal leg	85.32	15.72	2.45	-	56.09	9.44
Horse meat	109	21.5	2.5	-	75	10.10
Pork shoulder	13.2	16.89	7.05	-	50.02	6.59
Beef sirloin	112	20.1	3.5	-	59	9.19
Rabbit carcass	123.24	16.59	6.32	-	51.35	6.89
Goose carcass	140.63	5.78	13.04	-	32.8	2.11
Duck carcass	199.04	8.64	18.30	-	48.64	2.22
Turkey breast	83	19.2	0.7	-	49	11.85
Turkey drumstick	100	16.6	3.7	-	81	8.50
Chicken breast	98	21.5	1.3	-	58	11.24
Chicken drumstick	125	17.8	6	-	84	7.29

Taula 4: Taula comparativa d'energia, proteïna, greix, fibra i colesterol de diferents fonts d'aliments. Les espècies venen acompanyades del seu estat: adult (A) o larva (L). [14].



3.2.4. Al·lergicitat

Considerant primer la definició d'al·lergicitat, “Un aliment s’identifica com a al·lergènic quan s’informa que les persones reaccionen a ell d’una manera coherent amb les reaccions al·lèrgiques provocades pels anticossos Immunoglobulina E (IgE)”, s’ha trobat evidència un tant limitada sobre els efectes al·lèrgics dels insectes comestibles en humans. Alguns estudis suggereixen que certes persones poden tenir reaccions al·lèrgiques a alguns tipus d’insectes, especialment si ja són al·lèrgiques a altres aliments, com ara mariscs o crustacis [15].

En un altre estudi, es van identificar al·lèrgens similars als del marisc en els insectes comestibles, el que suggereix que algunes persones al·lèrgiques als mariscs podrien ser al·lèrgiques també als insectes comestibles. També es va trobar alguns individus que van consumir grills comestibles i van experimentar reaccions al·lèrgiques, com ara urticària i angioedema [16] [17].

Pel que fa als al·lèrgens específics presents en els insectes comestibles, s’ha identificat la tropomiosina, una proteïna present en molts invertebrats com a un al·lergen potencial en els insectes comestibles. Aquesta ha sigut identificada en diversos estudis fets per l’EFSA com el potencial al·lergen prevalent en espècies de la família *Tenebrionidae* entre altres tals com l’arginina quinasa, quitinases i altres [18].

S’ha descrit també la possible reactivitat creuada que pot tenir aquesta família d’insectes amb altres al·lèrgens, ja que s’ha observat que molts dels pèptids presents en les espècies tenien homologia amb les seqüències d’altres insectes, crustacis i àcars. El cas més notable, quantitatiu i observat ha sigut el del crustaci, on s’ha descrit com la tropomiosina de *T. molitor* va reaccionar amb el sèrum d’IgE d’un pacient al·lèrgic a la tropomiosina del crustaci, confirmant aquesta reactivitat creuada, on posteriorment es va comprovar i confirmar la reactivitat quan la proteïna de l’insecte era sotmesa a diferents processos. Paral·lelament es va trobar que pacients al·lèrgics a gambes també tenien risc d’al·lergicitat a la família d’insectes [19].

Com a últim punt a destacar, l’EFSA també va assenyalar que al·lèrgens addicionals poden acabar al insecte a consumir si aquests al·lèrgens han estat presents al substrat alimentat als insectes [18].

Tots els articles citats de l’apartat també destaquen la importància d’establir protocols de prova adequats per detectar les reaccions al·lèrgiques als insectes comestibles i d’identificar els al·lèrgens específics presents en aquests insectes. A més, es suggereix que els consumidors potencialment al·lèrgics han de ser conscients dels riscos i evitar els insectes comestibles si tenen antecedents d’al·lèrgies alimentàries [17].

En conclusió, encara que l’evidència actual és limitada, és important que els investigadors i la indústria dels insectes comestibles segueixin investigant els riscos al·lèrgics i la reactivitat creuada que pot presentar. Així es podrien prendre mesures específiques per garantir la seguretat alimentària dels consumidors.



3.2.5. *Tenebrio molitor* o escarabat de la farina

Aquesta espècie és una de les més utilitzades com a aliment arreu del món. Això degut a les diverses propietats que aquesta presenta, tenint un contingut en greix, proteïna i altres minerals i vitamines més que òptim.

Aquests nivells de nutrients han estat estudiats per l'EFSA molt recentment degut a l'aprovació d'aquesta espècie com a *Novel Food*, on s'han especificat en larves tant congelades, seques, assecades o en format de pols (Taula 10).

Cal especificar que aquest *Novel Food* que ja ha sigut aprovat per l'EFSA és exclusivament de les larves de *Tenebrio molitor* degut a factors nutricionals i toxicològics, ja que s'ha trobat que espècies adultes del insecte secreten benzoquinones com a sistema de defensa, fet que no s'ha trobat en les larves i que, per tant, les extinta de perill. Tampoc es van trobar inconvenients a nivell de genotoxicitat o toxicitat subcrònica rellevants i es va estudiar a fons els factors antinutricionals per a concloure d'igual forma que la composició del teòric *Novel Food* no es desavantatjós nutricionalment parlant [20].

Es va concloure que les formes congelades i assecades de la larva de *T. Molitor* eren, llavors, segures baix les condicions que ells proposaven per a utilitzar-ho i consumir-ho.

Ha sigut així, la font de proteïna que s'ha triat per a treballar en l'experiment.

3.3. El *Lupinus albus* o tramús com a font de proteïna alternativa a la proteïna animal

El *lupinus albus*, o més comunament conegut com tramús, és una altra font de proteïna amb gran potencial per a ser una alternativa proteica a les carns i que és relativament poc utilitzada arreu del món. El seu major productor i el continent amb més àrea d'aquest llegum cultivada és Oceania, amb un 64% i un 55% de la producció global. Només amb aquesta informació es pot interpretar la poca rellevància d'aquest llegum a les dietes d'arreu del món, ja que grans territoris com Àsia o Amèrica no cultiven ni tant sols un 6% de la producció global de tramús (Figura 4).

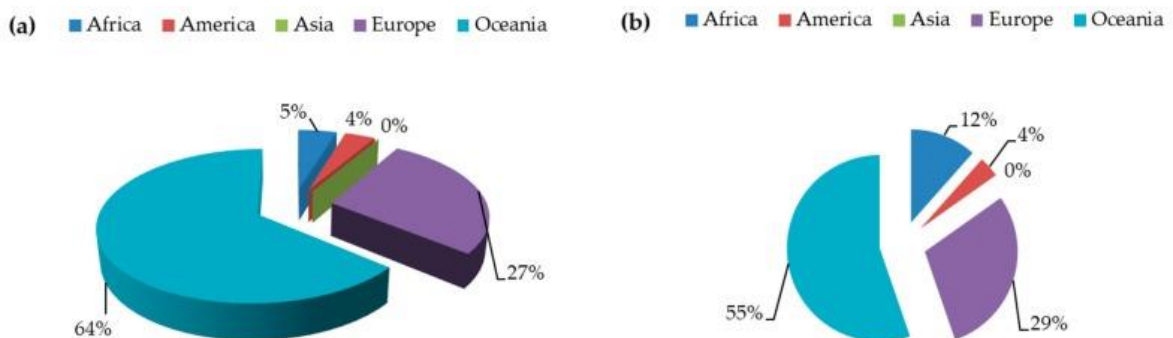


Figura 3: Gràfica de la distribució arreu del món de producció de tramús(a) i l'àrea cultivada (b),[21]



Com es pot apreciar, a Europa hi ha una major producció gràcies al seu ús en la regió del Mediterrani, en contrast a Àsia que no produeix gens del llegum en qüestió i a Amèrica, on el 4% surt del seu cultiu i consum a una regió específica de Sud-Amèrica [21].

3.3.1. Contingut nutricional

El valor nutricional del tramús depèn molt de l'espècie, genotips i zona on es cultivi, ja que s'han reportat casos del gran efecte de les condicions ambientals en la qualitat de les llavors.

En termes generals, totes tenen un alt contingut proteic i majors niells d'aminoàcids si ho comparem amb la soja. Tot i aquest fet, el gra de tramús té menys contingut de certs aminoàcids essencials per a la nutrició que la soja, tal i com s'ha comprovat amb les seves diferents espècies (Taula 5).

	<i>L. albus</i> ^a	<i>L. angustifolius</i> ^b	<i>L. luteus</i> ^c	<i>L. mutabilis</i> ^d
Crude Protein (% of DM)	33–47	31–37	37–38	32–52
Crude fibre (% of DM)	13–16	15–17	12–15	10
Metabolized Energy (MJ/kg DM)	13–16	12–13	10	na
Oil (%)	6–13	6–7	5–9	13–24
Total oligosaccharides (% of DM)	7–8	8–9	na	na
Non-starch polysaccharides (%)	18	47–51	na	na
Essential amino acids (g/16 gN)				
Lys	4.9–5.1	4.5–5.0	4.2–4.6	5.0–7.3
Met	0.6–0.7	0.6–0.7	0.6–0.7	0.4–1.4
Cys	1.8–2.1	1.3–1.6	1.8–2.5	1.4–1.7
Leu	7.5–8.0	6.0–7.6	6.1–7.3	5.7–7.8
Thr	3.1–4.0	3.0–3.3	2.6–3.2	3.0–4.0

Taula 5: Composició química de diverses espècies de tramús [21]

El contingut d'olis en el llegum, tot i ser baix, destaca per tenir una taxa de àcids grassos insaturats/àcids grassos saturats d'alta qualitat.

El principal problema anti-nutricional del tramús radica en la seva composició de carbohidrats, on s'observen baixos nivells de midó en contrast a alts nivells d'oligosacàrids de rafinosa. Aquest factor contribueix a una reducció del contingut digerible i a una menor digestió. Això comporta una aplicació de mètodes de processament per a eliminar aquest factors, que desemboca en una menor eficiència



d'ús i probablement una de les principals raons de la seva poca popularitat arreu del món [21].

3.3.2. Al·lergenicitat

De forma relativament recent s'ha suggerit els perills al·lèrgics i d'anafilaxis del tramús, fet que el va portar a una major regulació per la Comissió Europea. Aquests components al·lèrgics es van trobar en les seves proteïnes d'emmagatzematge anomenades conglutines, més concretament a les regions α i β . S'ha observat també casos de reactivitat creuada entre el tramús i altres espècies lleguminoses, donant una clara relació i recomanant cautela a les poblacions que ja tinguin predisposició a alguna al·lèrgia de llegum i sobretot a cacauet.

Aquesta situació per tant ha de ser adreçada per als cossos responsables de la seguretat alimentària arreu del món, ja que tot i haver-hi diversos estudis i proves del perill que pot causar el tramús com a al·lergen, no s'han fet les mesures adequades exceptuant a Europa gràcies a entitats com l'EFSA [22].

3.4. Model in vitro per a avaluar al·lergenicitat: Línia cel·lular KU812 de basòfil humà

La línia cel·lular KU812 va ser establerta per l'investigador K. Kishi al 1985 . Aquestes cèl·lules provenien d'un pacient amb leucèmia mieloide crònica en fase de blasts, el que significa que són cèl·lules immadures que es divideixen ràpidament.

S'ha fet una caracterització d'aquesta línia a nivell morfològic, immunològic i de citogenètica. També s'ha sotmès per a mesurar histamina intracel·lular i amb totes les proves fetes s'ha classificat com a una línia amb potencial per a utilitzar-se per a l'anàlisi de la proliferació i diferenciació de basòfils [23].

Per tant s'observa que aquesta línia té la capacitat de produir histamina i altres substàncies químiques inflamatores que juguen un paper important en la resposta al·lèrgica, propietat que l'ha portat a utilitzar-se sovint com a model per estudiar l'al·lèrgia i la inflamació. Els investigadors exposen cèl·lules a diferents al·lèrgens i observen com responen en termes de producció d'histamina i altres mediadors inflamatoris [23].

Més específicament, aquesta línia funciona en reaccions hipersensibles immediates amb alliberament de mediadors d'al·lergenicitat actius mediat per Immunoglobulina E (IgE). Aquests mediadors estan o bé entre els grànuls o són produïts a partir de components de la membrana durant la reacció d'alliberament mediat per IgE. La importància de KU812 és que entra dins d'un dels dos únics tipus de cèl·lules que es coneixen que expressin l'alta afinitat del receptor per IgE, i per tant ens dona un objectiu segur a l'hora de treballar en investigacions d'al·lergenicitat [24].



A més, els investigadors també utilitzen les cèl·lules KU812 per avaluar l'eficàcia de diferents medicaments antial·lèrgics i antiinflamatoris, deixant-lo com un important recurs que ha donat una millor comprensió de mecanismes subjacents d'aquestes condicions i ha ajudat a identificar noves opcions de tractament.

Es justifica així la utilització d'aquestes cèl·lules per a l'experiment, ja que són òptimes per al que es busca en aquest treball.

3.5. Activitat enzimàtica β -hexosaminidasa: Marcadore de desgranulació KU812

Les beta-hexosaminidases són enzims lisosomals que eliminen residus de N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina unides beta-glicosídicament terminalment en diversos glico-conjugats. Els assajos fets són particularment importants per a la diagnosi d'una sèrie de malalties relacionades en l'emmagatzematge lisosomal. Més enllà d'aquesta, que fins fa poc era el focus d'interès d'aquest compost, s'ha trobat recentment una associació entre nivells elevats de hexosaminidasa alliberats i una varietat de malalties inflamatòries[25].

Aquesta relativa nova funció ja l'ha portat a fer assajos de potencials al·lèrgens, on s'ha descrit com a un mètode simple, ràpid i barat, amb l'important característica de poder predir l'al·lèrgia abans que pugui ocórrer la reacció.

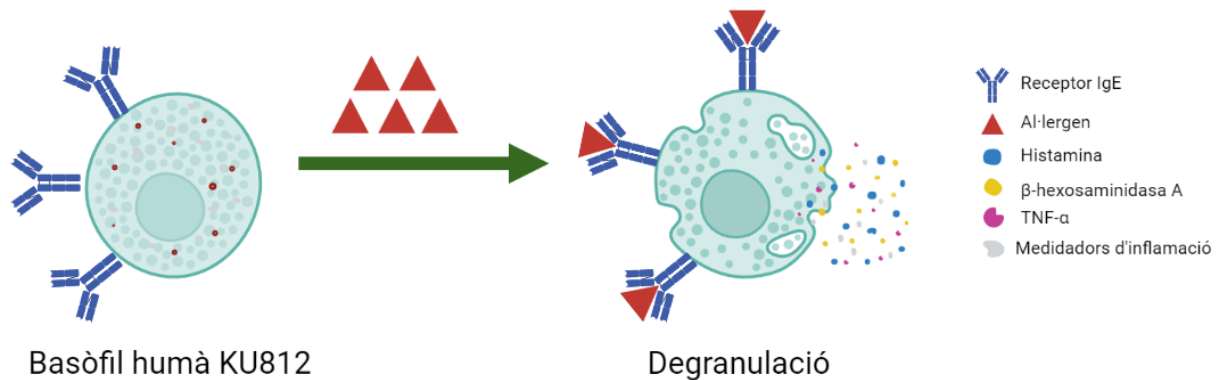


Figura 4: Esquema de la desgranulació d'una cèl·lula basòfila.

El fonament d'aquesta funció és que quan un antigen causatiu s'uneix a un IgE específic en la superfície del basòfil, hi ha un alliberament de diferents components. Entre aquests hi trobem la β -hexosaminidasa i la histamina, que és l'habitualment associada a les reaccions al·lèrgiques i que se sol utilitzar per fer assaigs d'aquesta per quantificar el seu alliberament. El problema de la mesura d'alliberament d'histamina és que és més cara i laboriosa, essent habitualment mesurada amb un ELISA competitiu.



L'assaig de l'activitat β -hexosaminidasa (β -hex) es caracteritza per ser mesurada amb colorimetria, fet que sol simplificar materials i mètodes, a diferència del mètode anteriorment comentat [26].

3.6. Altres alternatives proteïques per a afrontar el problema de la sostenibilitat alimentària

D'altres alternatives al consum de carn que s'estan estudiant avui en dia a part de les ja mencionades, són dues: la carn cultivada en laboratoris i la carn d'imitació.

La carn cultivada és una forma de produir carn utilitzant cultius de cèl·lules mare animals. Aquestes cèl·lules són cultivades en un medi ric en nutrients i estimulades perquè es diferenciïn i es converteixin en cèl·lules musculars. Aquest procés té l'avantatge de requerir menys nutrients i permetre un creixement ràpid de la carn. No obstant això, encara hi ha desafiaments en termes d'eficiència energètica, ús d'aigua i matèries primeres. Un exemple d'aquesta falta d'eficiència és que el medi de cultiu es pot produir a partir de materials d'origen animal com el sèrum boví, però això ja anul·la molts dels beneficis de sostenibilitat de la carn cultivada i tot i que existeixen mètodes per a produir medis de cultiu lliures de recursos animals (per exemple l'ús de cianobacteris hidrolitzats o extractes de fongs *Maitake*, segueix suposant un gran repte [27].

També s'observa una tendència de l'augment de no tant sols estudis en el tema de la carn cultivada, sinó en estudis sobre l'acceptació dels consumidors (Figura 1) [28] [29].

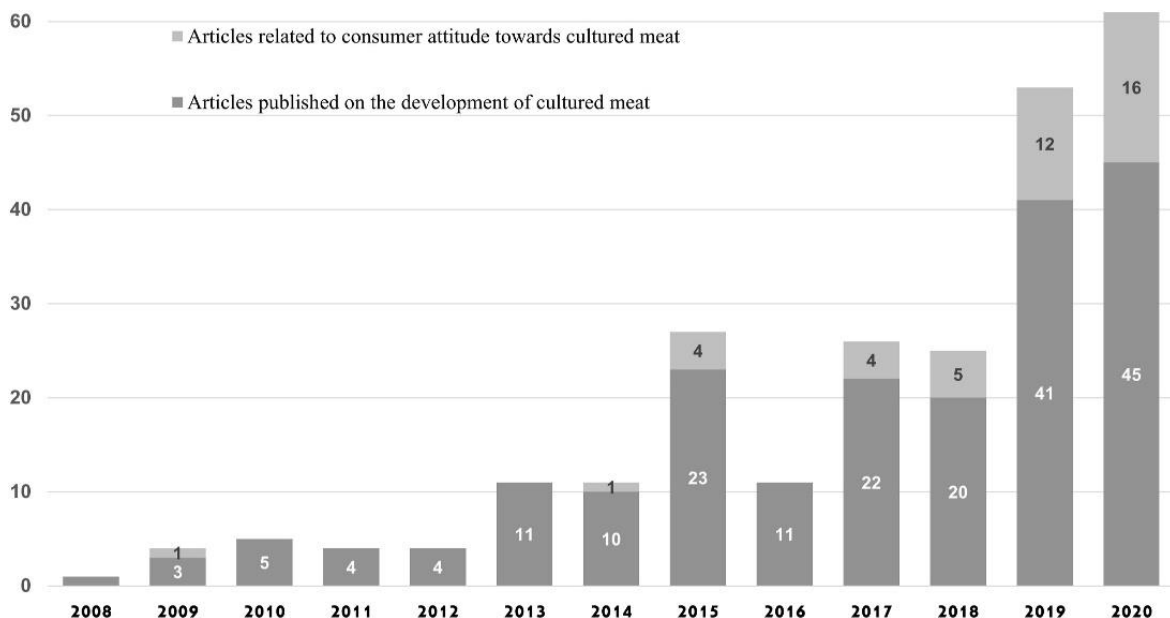


Figura 5: Gràfica que ens mostra la quantitat d'articles relacionats amb l'actitud dels consumidors respecte la carn cultivada i la quantitat d'articles publicats relacionats amb el desenvolupament de la carn cultivada al llarg dels anys [29]



Per tant, les empreses hauran de tenir en gran consideració que si volen vendre la carn com un substitut positiu per al medi ambient, hauran d'utilitzar energia renovable durant el procés, ja que a llarg termini, la producció de carn cultivada pot produir més escalfament que el propi bestiar, relacionant-ho amb la gran quantitat de CO₂ produït al fer carns sintètiques en contrast al CH₄ produït pel bestiar [30].

En quant als consumidors, s'ha analitzat l'acceptació a gent amb estudis i a diversos científics, i les seves opinions eren relativament variades. Tot i que més de la meitat de la gent a qui se li va fer l'enquesta pensava que la "carn artificial" era una opció viable, no ho trobaven com una opció que arreglés el problema del consum.

Una altra alternativa que es dona de fa anys és la carn d'imitació. Aquesta té l'objectiu de copiar tipus específics de carn en aspecte, textura, sabor i qualitats nutricionals sense utilitzar productes càrnics. Els productes més utilitzats per a crear aquesta carn falsa són derivats de la soja, com tofu i *tempeh*; que tenen un alt contingut proteic adequat per a humans. El problema és que a l'hora de manufacturar-lo per a que tingui les característiques desitjades, els rentats, bullits i premsats porta a pèrdues en greixos i contingut proteic, a part d'una gran despesa energètica que fa pujar molt el preu del producte. Tot i aquesta pujada de cost, segueix essent un producte més rentable a nivell energètic que la carn cultivada o bé la carn normal i també cal mencionar la relativament poca pèrdua de proteïna degut a la relativa simplicitat dels processos.

Un punt comú de tots aquests estudis sobre les alternatives n'és un que ja hem mencionat anteriorment: l'acceptació i adaptació als consumidors. Avui en dia aquest complica el seguiment dels avenços en aquest camp, cosa que no impedeix que els pocs recursos que es destinin siguin útils i donin noves aportacions en el tema; però el problema s'ha d'erradicar a base d'adaptació i acceptació d'aquesta classe d'aliments, perquè amb aquest apartat s'ha pogut observar la quantitat de problemes que es podrien solucionar amb una simple reducció del consum de la carn per part de la societat gràcies a obtenir alternatives viables. Avui en dia, l'entomofàgia s'esta promovent a molts de nivells, introduint-se en l'educació primària i publicitat-se en webs que promouen i son conscients dels beneficis de l'alternativa.

Per tant, s'ha de demostrar que aquesta mena de productes realment no ens perjudiquen, fent la reducció del consum de carn més fàcil i factible.



4. Hipòtesi i Objectius

Ens centrarem en estudiar la possible al·lergenicitat de diferents fonts de proteïna animal i vegetal, posant en marxa un mètode de cultiu cel·lular i l'assaig d'un biomarcador enzimàtic que ens ajudarà testar aquesta activitat. Ens posarem diversos objectius a assolir:

- Utilitzar diverses eines bioquímiques i biotecnològiques per a testar la possible al·lergenicitat de cèl·lules en cultiu a partir de la posada a punt d'un assaig senzill.
- Optimització d'aquesta metodologia d'avaluació i determinar si és més assequible i eficaç que la metodologia basada en la quantificació d'histamina.
- Posar a punt el mètode de cultiu, l'assaig del biomarcador d'al·lergenicitat i testar diferents extractes de proteïnes alternatives.
- Revisar la bibliografia per a comparar i correlacionar les tècniques utilitzades.
- Observar si amb aquests mètodes es pot determinar la sensibilitat a certs aliments per a desencadenar en una resposta al·lèrgica, si funciona correctament i si és el suficientment significatiu com per a que es consideri biotecnològicament factible utilitzar aquesta metodologia respecte a una altra en determinats casos.

5. Materials i Mètodes

5.1 Cultiu cel·lular

El primer punt a realitzar és del cultiu de les cèl·lules KU812 utilitzades. Aquestes han sigut cedides pel Dr. Kirshenbaum, qui treballa al Institut Nacional d'Al·lèrgies i Malalties Infeccioses (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID) als Estats Units d'Amèrica i que col·labora amb el Grup de Recerca Mobiofood de la Universitat Rovira i Virgili.

Per a cultivar-les, s'ha utilitzat un medi RPMI 1640 en flascons de 50 i 10ml per a mantenir-les en suspensió, sempre dins de l'estufa a 37C i 5% CO₂ i sempre en condicions d'esterilitat. Aquest medi era suplementat amb sèrum de vedella fetal (FBS) quan necessitàvem una major concentració de cèl·lules al medi, i si no eren en el RPMI 1640 mencionat que servia com a medi de manteniment.

En utilitzar cèl·lules no adherents, per a substituir el medi o rentar les cèl·lules, primer cal centrifugar (Hettich Mikro 200R Refrigerated Centrifuge) les cèl·lules 5 minuts a 450 x g a temperatura ambient i llevar el sobrenedant amb cura.

Les cèl·lules hauran de passar per un tractament previ per a tenir-les en les condicions que requereix l'experiment.

Quan les cèl·lules estiguin en la concentració adequada per a utilitzar-se, un dia abans es deixen 24h amb l'IgE humana a una concentració de 100ng/mL per sensibilitzar-les.



Després de la sensibilització, es renten les cèl·lules 3 vegades amb 10mL d'HEPES buffer (pH = 7,4, 37°C) per eliminar l'excés d'IgE.

Finalment, cal mencionar que totes les incubacions s'han fet en un ambient a 37°C, 5% CO₂ i en humitat ambient, si no s'especifica el contrari. Les solucions i l'equip que entrin en contacte amb la cèl·lula han estat esterilitzades i quan es manipulin aquestes s'ha de treballar constantment amb tècniques asèptiques i dins d'una campana de flux laminar (Telstar AV-100).

5.2 Extractes rics en proteïna a testar

Un factor a tractar prèviament han sigut els tractaments enzimàtics de les fonts de proteïnes utilitzades. Les diferents farines a analitzar havien estat amb enzims i temperatures per simular el tracte gastrointestinal, és a dir, que havien estat digerides *in vitro* amb l'ús d'amilasa, pepsina i pancreatina.

En el present estudi, s'han utilitzat els extractes digerits de dos tipus de tramús, el d'insecte, el d'ametlla, el de la soja i el de la vedella. Aquests extractes es trobaven en una concentració de 60mg/mL (Imatge 1: Imatge dels extractes digerits. Font pròpia Imatge 1).

Les concentracions treballades de cada extracte proteic han sigut en el rang de 0,6mg/ml fins a 0,07mg/mL. Això perquè s'han revisat estudis que treballaven en tècniques similars per avaluar l'al·lergenicitat les proteïnes i totes coincidien en l'ús de <1mg/mL d'extracte proteic. Per tant, hem treballat concretament amb 0'6, 0'3, 0'15 i 0'07mg/mL de cada extracte [25].

5.2.1 Establir controls

Una punt molt important de qualsevol experiment és tenir clar els controls que es faran per establir bases, punts que donin positius en comparació als que puguin sortir a l'experiment i controls per saber els llocs per on pot fallar l'experiment.

En aquest cas, com a controls del material utilitzat, es va plantejar primer que tot els controls dels enzims i el control de les cèl·lules.

Posteriorment, es va haver d'establir un control positiu, és a dir, un compost amb el qual tractéssim les cèl·lules i reaccionés sí o sí provocant la desgranulació de la cèl·lula. Aquest compost elegit va ésser el C48/80.

Aquest compost és un polímer produït a partir d'una condensació entre el *N-metil-p-metoxifenilamina* i el formaldehid. Té la característica de promoure l'alliberament d'histamina i altres components presents en la desgranulació que veurem posteriorment. En termes més generals, el que fa és promoure la desgranulació de mastòcits i basòfils.



La funció ja ha sigut demostrada en una gran diversitat d'articles i s'ha comprovat l'alliberament de diversos components, entre els quals la β -hexosaminidasa, que serà el nostre focus d'atenció. Ens haurem d'assegurar també que els percentatges del compost alliberat es corresponguin amb els dels articles que treballin en les mateixes concentracions de C48/80[31].

Per últim, s'estableix un control negatiu. Aquest és molt important perquè ens servirà de factor de correcció per a cada experiment. És a dir, normalitzar i igualar valors de cada experiment en cas que donin resultats diferents. El control triat va ser l'HEPES *buffer* amb el qual es feien els rentats i es preparaven les dilucions dels extractes proteics.

Un aspecte que també s'ha de considerar abans de fer l'experiment és planificar bé els pouets que utilitzarem, tant en quant a proporcions de tractament diferent, com controls, com tipus de tractaments que farem.

Es tractaran en plaques de 24 les cèl·lules amb els extractes proteics corresponents per a obtenir les mostres per a avaluar el blau tripà (Taula 11).

Establirem la taula de la β -hex (Taula 12) on hi afegirem tots els reactius finals i ho determinarem amb el mètode d'espectrofotometria.

5.3 Assaig de blau tripà

5.3.1 Fonament

L'assaig de blau tripà s'utilitza en tincions histològiques com a tint d'exclusió, concretament en assaigs on es permet diferenciar cèl·lules vives de mortes, donant un percentatge de viabilitat. El fonament és que les cèl·lules/teixits amb la membrana intacta no es tinten, ja que aquestes membranes són selectives respecte al compost que les pugui travessar; selectivitat que no es dona en cèl·lules amb la membrana danyada i, per tant, mortes. L'únic problema que pot presentar l'assaig és que el tint no diferenciï entre cèl·lules mortes per necrosi o per apoptosi, però en el nostre cas ens farà una aproximació més que suficient per a correlacionar amb altres resultats.

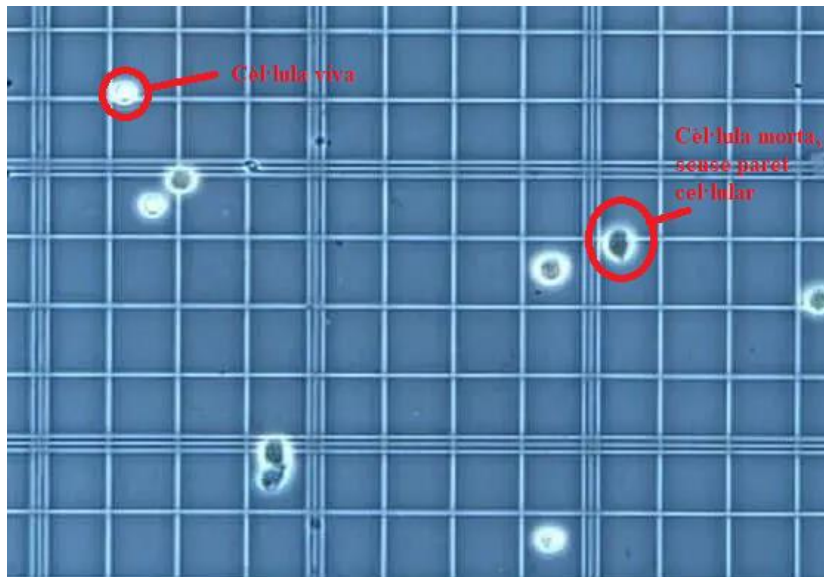


Figura 6: Exemple de tinció amb blau tripà. Font:Allevi Protocols, 2022

Aquest assaig és de gran interès per al nostre experiment perquè si exposem les cèl·lules cultivades a un cert agent que pugui donar un efecte citotòxic, podrem obtenir la viabilitat d'una forma ràpida i efectiva.

5.3.2 Material

En quant al material, necessitarem el reactiu blau tripà, xeringues, puntes per filtrar el contingut de les xeringues, tubs de diferents mides sotmesos a l'autoclau i lliures de RNAsa/DNAsa, una cambra de Neubauer (Optik Labor) amb els respectius cobreobjectes, pipetes, puntes estèrils, un microscopi òptic (Nikon Eclipse TE2000-S)(Imatge 12) i la una cambra de flux laminar (Telstar AV-100)(Imatge 10) on treballar en asèpsia, esterilitzant els tamps per autoclavat.

5.3.3 Procediment

El treballen les cèl·lules amb una densitat d'entre 10.000 i 20.000 cèl·lules per pou, fent un recompte directe del cultiu en el medi prèviament esmentat i diluint-les si és necessari. Es posa en cada pou d'una placa de 24 pouets 450µL del medi amb cèl·lules i hi afegirem 50µL del tractament corresponent. S'ha de deixar incubar 4 hores.

Un cop acabada la incubació, ja tindrem les cèl·lules KU812 tractades amb el possible al·lergen. Prepararem tubs d'1,5ml; una meitat on posarem les mostres i l'altra meitat per posar la quantitat de mostra i de blau tripà que correspongui i que es combini bé.

Ens assegurarem de re-suspendre bé els pouets on hem fet els tractaments per agafar cèl·lules. Un cop ho tinguéssim en els tubs (la primera meitat d'ells), passarem a treballar a la cambra de flux laminar.

Ja dins de la cambra, i abans de començar amb l'altra meitat dels tubs, en prepararem un altre on posarem el blau tripà. Ens serà suficient amb 1mL. Amb una xeringa agafarem



el reactiu i un cop es plena es posa a la punta un filtre de xeringa i passem el contingut al tub on tindrem el blau tripa que utilitzarem (Imatge 3).

Amb això ja ho tindrem tot llest per preparar la segona meitat de tubs, on posarem 15µL de les nostres cèl·lules tractades i 15 µL del colorant. Farem *up and down* per assegurar-nos d'agafar les cèl·lules que hem de posar dins dels nous tubs amb el colorant.

Després, amb una pipeta de 10µL amb aquest mateix volum, farem més *up and down* per barrejar bé el colorant i les cèl·lules, i n'agafarem per a posar-ne a la cambra de *Neubauer*, on farem el recompte de viabilitat cel·lular per a cada tractament (Imatge 2: Recompte de cèl·lules al microscopi. Font pròpia).

5.4 Activitat β -Hexosaminidasa en KU812

5.4.1 Fonament

Es basarà gran part d'aquest assaig en un protocol previ per mesurar l'alliberament del mediador, on es descriu el tractament de les cèl·lules i les composicions de cada reactiu utilitzat. S'ha adaptat el protocol degut al tipus cel·lular que s'ha utilitzat; les KU812 humanes que creixen en suspensió [32].

5.4.2 Material

El material del qual haurem de disposar seran: centrifugues refrigerades, plaques de 96 pouets, un pH-metre i un espectrofotòmetre (BioTek Eon)(Imatge 14) amb capacitat de mesurar l'absorbància a 405nm. En quant a reactius, seran necessaris un HEPES Buffer (Hepes), PNAG, Citrat Buffer, Glicina, IgE i Tritó X-100. Es descriuran als procediments els components i mesures del material per a fer alguns dels buffers (Annex V).

5.4.3 Procediments experimentals

5.4.3.1 Preparació dels reactius

Tots els reactius s'han preparat amb aigua destil·lada en el volum que s'ha requerit per a cada experiment, calculant en base a la massa molecular i la concentració indicada al protocol (Annex V).

Tots han sigut pesats curosament en balances analítiques o de precisió (Sartorius Balance)(Imatge 4)(Imatge 13).

5.4.3.2 Assaig β -Hexosaminidasa

Un cop tenim les nostres cèl·lules tractades amb IgE i rentades tal i com s'ha especificat al apartat 5.1.1, es re-suspenen les cèl·lules en Hepes i s' aliquoten a una placa de 96



pous. S'ha de tenir en compte el recompte previ, ja que es necessitaran unes 5000-10000cèls/pou. També s'ha de tenir en consideració que el volum final per pou serà de 100µL, així que es farà el càlcul per posar 90µL per pou a 96 pous en total (Imatge 6).

Un cop al·liquotat, es farà la primera incubació a 37°C durant 10 minuts.

Posteriorment posarem els 10µL d'agonista ó mostra corresponent per als 96 pous. En aquest cas els agonistes seran (Imatge 7):

- Els controls positius de C48/80 a 10µg/mL i 50µg/mL
- Les proporcions de 0'6, 0'3, 0'15 i 0'07mg/mL de cada tractament
 - o Tramús 1 (L1)
 - o Tramús 2 (L2)
 - o Insecte (I)
 - o Soja (S)
 - o Ametlla (A)
- Els controls d'enzims i de cèl·lules, Hepes.

S'ha al·liquotat cada tractament a cada concentració per triplicat (Taula 14) per així corregir l'error de colorimetria. Els stocks de les dilucions de l'agonista es prepararan també curosament amb HEPES Buffer.

Un cop posat l'agonista, s'incubarà un altre cop a 37°C, però durant 4 hores. Durant aquestes 4 hores el que es fa és buscar, pesar i preparar els reactius de la β-hex que s'han descrit abans, al volum que convé segons l'experiment. Es va utilitzar el full de càlcul d'Excel per automatitzar els càlculs segons el volum necessari.

Un cop preparada la glicina, el citrat buffer i el tritó al volum que es desitja, s'espera fins que quedi poca estona d'incubació per pesar el PNAG, el qual s'afegeix al citrat buffer. S'ha de tenir en consideració que aquest component és difícil de dissoldre i que probablement es necessitarà barrejar-ho amb un imant dins de la pròpia solució i també pujar la temperatura de la solució de citrat buffer per a que es pugui dissoldre de manera òptima.

Amb això fet, s'al·liquotaran 100ul/pou de la solució de PNAG a una nova placa de 96 amb l'ajuda d'una pipeta multicanal (Imatge 8).

Quan acabi la incubació de 4 hores, es centrifuga la placa durant 4 minuts, a 450 x g i a 4°C per parar la reacció i assegurar-se que les cèl·lules es trobin a la base de la placa. Amb cura, s'extrauen 50µL dels sobrenedats de la placa original i s'afegeixen a la placa a la qual li hem posat la solució de PNAG. Aquesta s'incuba durant 90 minuts a 37°C i sense CO₂.

Quan s'acabi d'incubar, es posen 150µL de Tritó-X-100 a la placa original, es re-suspèn amb cura, i posteriorment s'agafen 50uL de cada lisat i s'afegeixen a la solució de PNAG. Aquest component servirà per trencar la paret cel·lular i obtenir així l'activitat del lisat cel·lular. Ho incubarem 90 minuts a 37°C, sense CO₂.



Un cop acabada aquesta última incubació, es posen 40µL de glicina a cada pou. Es pot observar una coloració a nivell òptic. El color grogós indicarà la presència d'activitat β-hexosaminidasa (Imatge 9).

Es determinarà l'absorbància a 405nm i podrem així calcular el percentatge de β-hexosaminidasa alliberat en cada cas amb la fórmula proporcionada pel protocol citat:

$$\% \text{ alliberat} = 100 * \frac{2 * \text{sobrenedant}}{(1/2 * \text{sobrenedant}) + (4 * \text{lisat})}$$

Es va fer l'experiment per triplicat per a cada mostra, per tal de fer una estadística i tenir uns resultats fiables i útils.

En la placa (Taula 6), tindrem del número 1 al 6 el sobrenedant i del 7 al 12 el lisat cel·lular amb Tritó-X-100. El càlcul de l'activitat total es farà amb les dues.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,094	0,094	0,107	0,114	0,096	0,11	0,251	0,263	0,263	0,222	0,233	0,257	405
B	0,113	0,119	0,129	0,104	0,092	0,108	0,232	0,219	0,216	0,216	0,266	0,246	405
C	0,158	0,15	0,19	0,116	0,097	0,107	0,245	0,188	0,185	0,19	0,239	0,228	405
D	0,092	0,102	0,105	0,107	0,095	0,114	0,256	0,263	0,197	0,203	0,243	0,243	405
E	0,096	0,102	0,126	0,106	0,099	0,106	0,243	0,274	0,22	0,213	0,237	0,253	405
F	0,098	0,101	0,106	0,108	0,098	0,101	0,25	0,227	0,219	0,228	0,355	0,234	405
G	0,095	0,11	0,096	0,101	0,105	0,108	0,268	0,214	0,2	0,204	0,214	0,241	405
H	0,095	0,099	0,106	0,108	0,108	0,114	0,228	0,234	0,218	0,216	0,255	0,257	405

Taula 6: Exemple de placa de l'assaig β-hex

Per exemple, per calcular l'activitat del primer mostreig d'Hepes (columna A, fila 1 per a sobrenedant i 7 per a lisat), faríem el següent:

$$\%Bhex = 100 * \frac{2 * 0,094}{\left(\frac{1}{2} * 0,094\right) + (4 * 0,251)} = 17,72$$

Així doncs, al full de càlcul posarem tota la taula en un ordre determinat per fer els càlculs per a cada experiment (Taula 8).

S'han fet triplicats de l'experiment per a cada mostra testada.

5.5 Mètodes estadístics

Quan es tinguin totes les dades dels experiments extretes, hauran de ser ajuntades per a aplicar mètodes estadístics amb totes les dades conjuntes.

S'ha realitzat un test T de Student per a comparar les mitjanes en la viabilitat del blau tripà.



En quant a la β -hex, el primer que es farà serà posar tots els percentatges de β -hex calculats de cada mostra i passar un test de valors atípics (o test d'*outliers*) per a cada tractament.

Tot seguit es calcularà un factor de correcció de cada experiment en totes les mostres en base al HEPES. Es farà una mitjana de totes les mostres d'Hepes i es restarà cada mostra d'HEPES amb la mitjana. D'aquests valors es farà una mitjana de cada valor per grup d'experiment.

Un cop fet això, s'obtindrà una taula que es tornarà a passar pel test de valors atípics on tindrem tots els valors corregits i hi restarem la mitjana d'Hepes a cadascun, obtenint els valors finals.

Es faran les mitjanes, desviacions estàndard i errors de cada mostra tractada i ho passarem per tests estadístics.

Primer es farà una comparació de mitjanes amb T de Student, comparant el control d'enzims i els controls positius amb cada mostra.

Després es faran tests de normalitat amb l'eina XLSTAT i es comprovarà la credibilitat dels resultats de T de Student. Aquesta al haver sortit no paramètrica, ens obligarà a utilitzar un altre mètode estadístic de comparació de mitjanes; el test de *Kruskal-Wallis*. Aquest generarà una taula de comparació entre p-values i ens donarà aproximacions a les hipòtesis (Annex VI).

5.6 Resultats

5.6.1 Resultats assaig blau tripà

Amb la tinció selectiva es compten un total de 8 quadres de la cambra de *Neubauer* per mostra; tant les cèl·lules mortes com les vives. Fet el recompte, es feia un càlcul molt senzill per calcular el % de viabilitat de cada assaig:

$$\%viabilitat = 100 * \frac{cèl.vives}{cèl.vives + cèl.mortes}$$

S'ha calculat la mitjana, la desviació estàndard i l'error per a cada mostra, considerant si s'han eliminat valors atípics o no (Taula 7). Podem observar a primera vista que han sortit uns resultats sòlids i homogenis conforme al esperat; veient que el blanc (Hepes) dona un 100% de viabilitat i els controls positius donen una viabilitat molt més baixa, donant l'efecte desitjat i permetent creure els valors de tramús i d'insecte.

Per a una millor visualització, es fa una taula de les mitjanes amb els respectius errors i es representa (Figura 7).

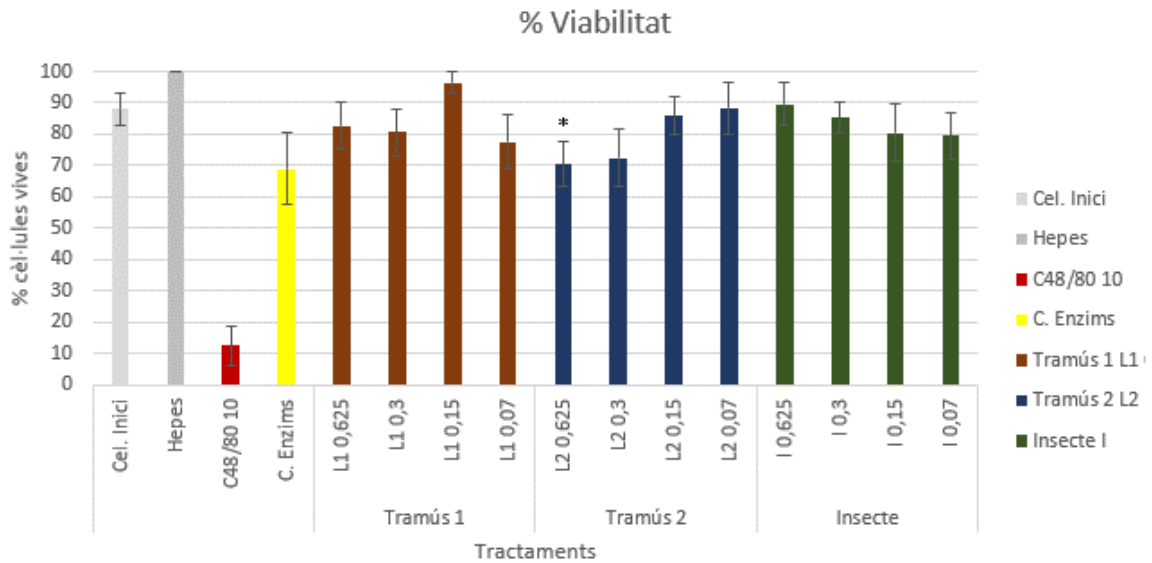


Figura 7: Gràfic dels % de viabilitat per assaig de Trypan Blue. Llegenda dels tractaments utilitzats en el rang de 0,62 a 0,07 mg/mL de tractament proteic utilitzat.

Visualitzem els efectes dels diferents tractaments proteics en la nostra línia cel·lular de forma qualitativa amb el tint.

- Les cèl·lules tractades amb les dues línies de tramús diferent tenen entre el 70 i el 95% de viabilitat, sense un efecte clar quan la dosi es redueix a la meitat.
- Les cèl·lules tractades amb insecte tenen una viabilitat entre el 80 i el 90%, sense tampoc haver una relació clara en la quantitat de dosi en no ser diferències significatives.
- *Al T de Student no s'han trobat diferències significatives de viabilitat respecte al control d'Hepes excepte amb la mostra de tramús 2 (L2) a 0,625mg/mL (Taula 15). En canvi, cap s'ha correspost significativament amb el control positiu.

Es pot observar (Figura 8) una viabilitat homòloga amb els resultats anteriors en quant als controls negatius i positius.

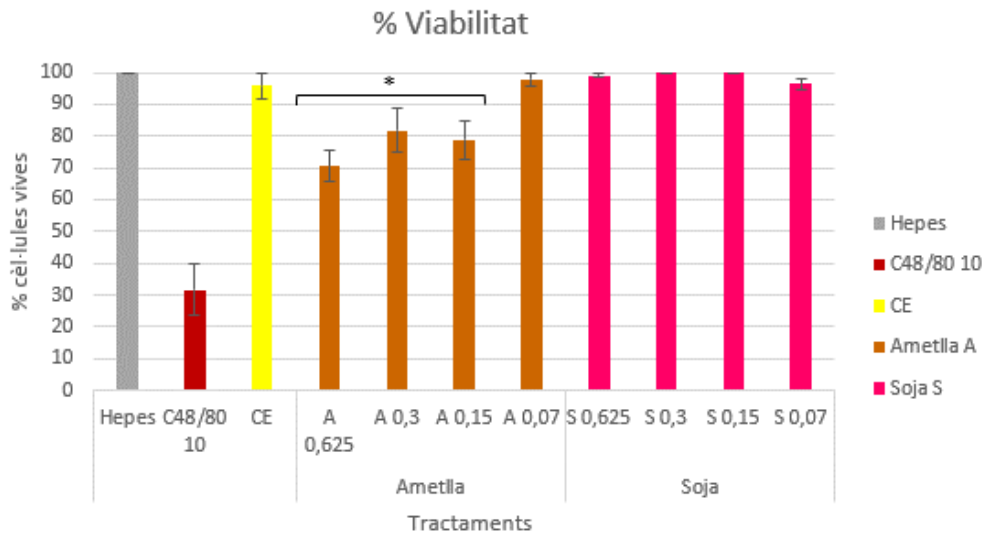


Figura 8: Gràfic de % de viabilitat amb Trypan Blue. Llegenda dels tractaments utilitzats, concentració indicada de tractament proteic utilitzat.

*L'únic resultat significativament diferent avaluat amb una comparació de mitjanes (T de Student) respecte al control d'Hepes ha estat l'ametlla en el rang de concentracions 0,625-0,15mg/mL(Taula 1 Taula 16).

5.6.2 Resultats β -Hexosaminidasa

En la mateixa taula on haurem calculat els percentatges de β -hex de cada mostra, calcularem la mitjana i la resta de mitjanes amb el control Hepes, el qual, com ja hem mencionat prèviament, serà el que ens marcarà el punt base i ens ajudarà a corregir l'error de cada experiment. Calcularem també la desviació estàndard i l'error de cada mitjana en base a les seves mostres (Taula 8).

Passats els factors de correcció en cada experiment, ens faltará restar el control HEPES a cada mostra per a obtenir els valors finals (Figura 9)

Restant el control d'Hepes i utilitzant el XLSTAT, es podrà interpretar que cap dels dos controls positius té una correlació significativa amb cap dels tractaments ($p < 0,05$) excepte en el d'ametlla, on en els dos controls negatius si tenen certa relació en quant a resultats ($p > 0,05$) (Taula 23).

Per contra i reafirmant aquesta interpretació, tots els tractaments excepte el d'ametlla si es corresponen amb el control negatiu (Taula 23). Utilitzarem el control d'enzims com a control negatiu per la seva correspondència amb els valors de l'Hepes. Quedará un resultat final que podrem interpretar gràficament (Figura 10):

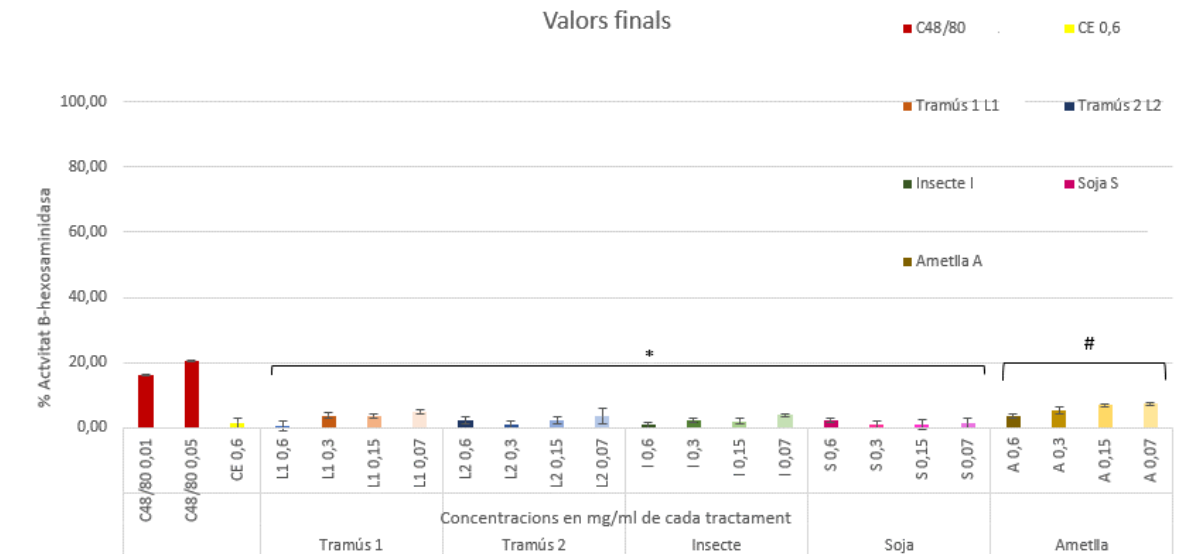


Figura 9: Valors finals d'activitat de β -hex. Llegenda de cada color per tractament; tractaments en mg/mL. C48/80 a les dues concentracions són el control positiu i CE és el control negatiu.

*Valors que presenten una diferència significativa amb el dos controls positius C48/80.

#Valors que no presenten diferència significativa amb el control positiu però per contra sí amb el control d'enzims.

5.7 Discussió dels resultats

És important considerar la posada a punt de la prova de la β -hexosaminidasa en les cèl·lules KU812 per a l'anàlisi de possible resposta al·lèrgica en front a diferents fonts proteïques, ja que sent una tècnica innovadora, avui en dia hi ha tècniques ja definides que resulten més sostenibles com l'ús de proteòmiques o d'altres més clàssiques com la prova dermatològica [25] [33].

En quant als resultats, es consideren notablement satisfactoris en consideració al que desitjàvem i al vist en la bibliografia, ja que hem aconseguit tant verificar la viabilitat cel·lular que dona cada tractament com mesurar l'alliberació de β -hexosaminidasa en cada compost que volíem [32], [34], [35].

En la viabilitat, s'ha observat l'efectivitat dels tractaments al no produir mort cel·lular i s'ha comparat amb els controls, corresponent-se amb resultats de la bibliografia [34].

Enfocant-nos en la prova de la β -hexosaminidasa, cal destacar que hem pogut contrastar l'efectivitat dels controls gràcies a estudis similars i ens ha permès utilitzar altres fonts de proteïna per fer una millor comparativa de resultats [36].

S'ha pogut comprovar així que en els dos extractes de tramús, el d'insecte i el de soja no hi ha hagut cap possible resposta al·lèrgica. Mentrestant, els resultats de l'ametlla, han donat una indicació de que el compost es correspon més amb els controls positius. Aquest fet es deu a que l'ametlla i els fruits secs donen lloc als al·lèrgens més comuns



trobat en humans, degut a tenir una gran diversitat de components proteics com la legumina, la vicilina, la oleosina i altres; de les quals s'ha trobat donar una resposta al·lèrgica encara que sigui baixa o poc notable en una gran part de la població [35] [37].

S'ha pogut avaluar, sense fer l'habitual test d'histamina, la inflamació que produirien les fonts de proteïna poc convencionals que ens interessin: l'insecte i el tramús. Aquestes han donat valors significativament baixos d'alliberació de β -hex respecte al control positiu i similars als control negatius, fet que podem relacionar directament amb una retinència per part de les cèl·lules humanes a aquestes proteïnes i per tant una possibilitat de ser una font explotable com a alternativa proteica per al consum humà. Per a reafirmar aquests resultats, seria òptim fer un test d'histamina per a comprovar els resultats.

Aquest fet es veu disminuït per la quantitat d'articles que hem mencionat als antecedents on s'esmenta una gran homogeneïtat amb proteïnes de crustaci per part de la proteïna provinent de l'insecte, produint de manera molt probable casos de reactivitat creuada o bé una reacció directa amb les pròpies proteïnes de l'insecte [5].

Un altre fet que cal discutir és que la IgE que s'ha utilitzat en el procés de desgranulació, era no específica per a cap antigen en concret que els extractes utilitzats poguessin tenir i que, per tant, aquest estudi serveix com a punt de partida per veure que en individus sense al·lèrgia, els extractes no creen més al·lergicitat que les fonts proteiques convencionals[5], [38].

Un pas més enllà que es podria fer a partir d'aquí seria comprovar si amb sèrum de pacients al·lèrgics a algun component que pugui provocar reactivitat creuada que poden tenir tant l'insecte com el tramús hi ha reactivitat; o bé, si amb una IgE específica d'antigen de crustaci també reacciona amb l'insecte, al estar més àmpliament estudiat[16]

Relacionat amb la rellevància biològica del model, també cal esmentar la limitació que suposa treballar en un model *in vitro*, en ser fora del tot del l'organisme, sempre hem de considerar que són estudis preliminars, on cal fer més estudis *in vitro* i finalment passar a testar *in vivo* per a obtenir conclusions més sòlides. Tot i això, tal i com s'ha esmentat a la hipòtesi, l'objectiu principal ha sigut buscar, trobar i comprovar una metodologia alternativa: més barata, ràpida i senzilla per mesurar l'al·lergicitat dels components.

Aquesta expectativa ha sigut confirmada i, a més a més, en utilitzar un model biològic humà, dona la possibilitat de treure informació útil.



6. Conclusions

A arrel dels resultats obtinguts, extrauríem les següents conclusions:

1. S'ha aconseguit posat a punt la metodologia per testar: cultivar una nova línia cel·lular i posar a punt l'assaig de determinació del biomarcador d'al·lergenicitat.
2. Respecte a la viabilitat cel·lular, cap dels extractes a les concentracions mesurades provoquen canvis en la viabilitat cel·lular mitjanat l'assaig de blau tripa en el rang de concentracions treballat.
3. L'assaig de β -hex dona valors de desgranulació del 20% en situacions basals, tal com surt a la bibliografia consultada, i el considerem correcte.
4. Després de testar l'al·lergenicitat de les fonts de proteïnes digerides *in vitro* del tramús i de l'insecte *Tenebrio molitor* junt amb soja, ametlla i vedella amb l'anterior metodologia, es conclou que cap d'aquestes fonts biològiques estimula la desgranulació *in vitro* a les concentracions mesurades excepte l'ametlla a concentracions entre 0,3-0,07mg/mL on hi augmenta aquesta respecte el control negatiu.
5. La IgE genèrica utilitzada ha servit per a saber que els extractes de proteïna analitzada no provoquen més al·lergenicitat que els controls, alhora que ens ha servit per a saber per on ampliar aquest estudi, ja que seria interessant utilitzar IgEs específiques tant de proteïna d'insecte com de crustaci per a fer noves comprovacions.
6. Cal deixar clar que encara no es cap metodologia definitiva i que li queda encara acabar-se de perfeccionar, i que aquest treball ha servit per a fer un pas endavant en aquesta direcció.

S'ha utilitzat un model de cèl·lules humanes *in vitro* per a una major utilitat real dels resultats i s'han obtingut uns resultats molt satisfactoris, assolint les expectatives de cada possible al·lergen i conclouent amb una baixa i negligible reactivitat al·lèrgica dels dos components d'interès, donant paral·lelament una possible reacció amb proteïna d'ametlla.



7. Autoavaluació

Aquest treball m'ha donat una gran oportunitat d'aprenentatge. No només m'ha ajudat a eixamplar el meu coneixement sobre una àrea que realment m'interessa, sinó que al mateix temps he pogut aprendre molt més sobre els treballs d'investigació, el treball en equip, la importància de les planificacions i a trobar la motivació i l'autodisciplina per a fer aquest treball al qual li tenia tanta por fa a dates d'avui fa un any.

Crec que és la peça de la carrera que més m'ha ajudat a formar-me i a créixer com a persona i com a biotecnòleg, al ser un treball que fas d'una manera relativament independent del que és una assignatura o unes pràctiques qualsevols. Ho trobo molt important per a cada alumne de la carrera, el trobar un tema que realment els motivi a fer un treball útil, interessant i original.

En quant a l'avaluació que em faig, crec que he sigut consistent en la meva feina, des que vaig saber del tema ja em vaig posar a buscar, guardar i llegir bibliografia relacionada amb ella, i abans de començar amb la part pràctica no només tenia llegits diversos articles relacionats, sinó una bona part de la introducció i antecedents fets. Durant la part de pràctiques i experimental vaig esforçar-me al màxim i vaig posar temps i ganes per a assegurar-me que tot sortís bé i que pugis quadrar amb les dates. Es van fer encara més proves i experiments durant les hores de pràctiques per a assegurar-nos que tots els resultats eren coherents; experiments que no hem pogut posar aquí perquè sinó el treball s'allargaria massa.

També he posat el meu màxim al acabar la part pràctica per a començar a redactar i tenir-lo acabat molt abans de les dates d'entrega per a tenir marge de correcció i revisió.

En conclusió, he aconseguit aprendre i gaudir molt alhora que fer un treball que pot arribar a ser d'utilitat per un futur.



8. Agraïments

En primer lloc m'agradaria agrair a la meva tutora professional, la doctora Maria Teresa Blay Olivé, qui no només m'ha donat l'oportunitat de treballar envers a un tema que tant m'interessa, sinó que m'ha guiat, ajudat, recolzat i ha sigut pacient amb mi a l'hora de fer tot aquest treball.

En segon lloc vull agrair-li a la Helena Segú Matamoros, doctoranda del departament MoBioFood qui ha estat amb mi dia a dia fent els experiments, ajudant-me quan no sabia que fer i ensenyant-me tantes coses importants que desconeixia a l'hora de treballar a un laboratori.

També, mencionant el departament de doctorands de MoBioFood, vull agrair a tots els seus integrants la calidesa amb la qual em van rebre i tractar dia a dia que vaig estar allí.

Per últim, agraeixo molt a la meva família, amics i companys de pis, qui m'han ajudat i donat suport en tot moment i sempre han tingut les meves esquenes si alguns dies acabava més cremat o cansat.



9. Bibliografia

- [1] a K. Chapagain and a Y. Hoekstra, “The green, blue and grey water footprint of farm animals and animal products,” *Unesco*, vol. 1, no. 16, 2010.
- [2] D. Vanham, A. Y. Hoekstra, and G. Bidoglio, “Potential water saving through changes in European diets,” *Environ Int*, vol. 61, pp. 45–56, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.envint.2013.09.011.
- [3] J. Pan *et al.*, “Recent Insight on Edible Insect Protein: Extraction, Functional Properties, Allergenicity, Bioactivity, and Applications,” *Foods*, vol. 11, no. 19, p. 2931, Sep. 2022, doi: 10.3390/foods11192931.
- [4] M. Shelomi, “The meat of affliction: Insects and the future of food as seen in Expo 2015,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 56, pp. 175–179, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.004.
- [5] A. van Huis, “Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security,” *Annu Rev Entomol*, vol. 58, no. 1, pp. 563–583, Jan. 2013, doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153704.
- [6] I. F. P. Research Institute (IFPRI), “Climate change: Impact on agriculture and costs of adaptation,” 2009. doi: 10.2499/0896295354.
- [7] F. L. C. Baranyovits, “Cochineal carmine: an ancient dye with a modern role,” *Endeavour*, vol. 2, no. 2, pp. 85–92, Jan. 1978, doi: 10.1016/0160-9327(78)90061-3.
- [8] M. A. Jäch, “Fried Water Beetles Cantonese Style,” *American Entomologist*, vol. 49, no. 1, pp. 34–37, 2003, doi: 10.1093/ae/49.1.34.
- [9] J. Szelei *et al.*, “Susceptibility of North-American and European crickets to *Acheta domesticus* densovirus (AdDNV) and associated epizootics,” *J Invertebr Pathol*, vol. 106, no. 3, pp. 394–399, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jip.2010.12.009.
- [10] A. G. Parker, “Mass-Rearing for Sterile Insect Release,” in *Sterile Insect Technique*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 209–232. doi: 10.1007/1-4020-4051-2_8.
- [11] L. Yi, C. M. M. Lakemond, L. M. C. Sagis, V. Eisner-Schadler, A. van Huis, and M. A. J. S. van Boekel, “Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species,” *Food Chem*, vol. 141, no. 4, pp. 3341–3348, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.115.
- [12] S. Khempaka, C. Chitsatchapong, and W. Molee, “Effect of chitin and protein constituents in shrimp head meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids, and ammonia production in broilers,” *Journal of Applied Poultry Research*, vol. 20, no. 1, pp. 1–11, Mar. 2011, doi: 10.3382/japr.2010-00162.



- [13] T. A. Reese *et al.*, “Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy,” *Nature*, vol. 447, no. 7140, pp. 92–96, May 2007, doi: 10.1038/nature05746.
- [14] A. Orkusz, “Edible Insects versus Meat-Nutritional Comparison: Knowledge of Their Composition Is the Key to Good Health.,” *Nutrients*, vol. 13, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/nu13041207.
- [15] E. Pennisi, “All in the (bigger) family,” *Science (1979)*, vol. 347, no. 6219, pp. 220–221, Jan. 2015, doi: 10.1126/science.347.6219.220.
- [16] R. Ayuso, G. Reese, S. Leong-Kee, M. Plante, and S. B. Lehrer, “Molecular Basis of Arthropod Cross-Reactivity: IgE-Binding Cross-Reactive Epitopes of Shrimp, House Dust Mite and Cockroach Tropomyosins,” *Int Arch Allergy Immunol*, vol. 129, no. 1, pp. 38–48, 2002, doi: 10.1159/000065172.
- [17] S. van Broekhoven, S. Bastiaan-Net, N. W. de Jong, and H. J. Wichers, “Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species,” *Food Chem*, vol. 196, pp. 1075–1083, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.033.
- [18] D. Turck *et al.*, “Safety of frozen and freeze-dried formulations of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* larva) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283,” *EFSA Journal*, vol. 20, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.2903/j.efsa.2022.7325.
- [19] L. De Marchi, A. Wangorsch, and G. Zoccatelli, “Allergens from Edible Insects: Cross-reactivity and Effects of Processing,” *Curr Allergy Asthma Rep*, vol. 21, no. 5, p. 35, May 2021, doi: 10.1007/s11882-021-01012-z.
- [20] D. Turck *et al.*, “Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283,” *EFSA Journal*, vol. 19, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.2903/j.efsa.2021.6343.
- [21] E. Abraham *et al.*, “The Use of Lupin as a Source of Protein in Animal Feeding: Genomic Tools and Breeding Approaches,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 4, p. 851, Feb. 2019, doi: 10.3390/ijms20040851.
- [22] M. L. Sanz, M. D. De Las Marinas, J. Fernández, and P. M. Gamboa, “Lupin allergy: a hidden killer in the home,” *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 40, no. 10, pp. 1461–1466, Oct. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03590.x.
- [23] K. Kishi, “A new leukemia cell line with philadelphia chromosome characterized as basophil precursors,” *Leuk Res*, vol. 9, no. 3, pp. 381–390, Jan. 1985, doi: 10.1016/0145-2126(85)90060-8.
- [24] T. Blom, R. Huang, M. Aveskogh, K. Nilsson, and L. Hellman, “Phenotypic characterization of KU812, a cell line identified as an immature human basophilic leukocyte,” *Eur J Immunol*, vol. 22, no. 8, pp. 2025–2032, Aug. 1992, doi: 10.1002/eji.1830220811.



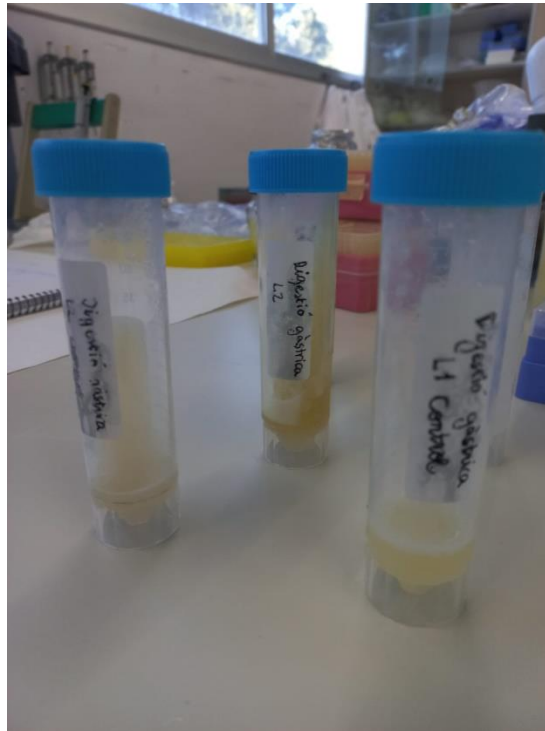
- [25] M. Wendeler and K. Sandhoff, “Hexosaminidase assays,” *Glycoconj J*, vol. 26, no. 8, pp. 945–952, Nov. 2009, doi: 10.1007/s10719-008-9137-5.
- [26] P. Zhang, Y. Shi, X. He, W. Sun, Y. Lv, and X. Hou, “Study on screening potential allergenic proteins from infant milk powders based on human mast cell membrane chromatography and histamine release assays,” *J Pharm Anal*, vol. 9, no. 1, pp. 55–61, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.jpha.2018.08.004.
- [27] H. L. Tuomisto and M. J. Teixeira de Mattos, “Environmental Impacts of Cultured Meat Production,” *Environ Sci Technol*, vol. 45, no. 14, pp. 6117–6123, Jul. 2011, doi: 10.1021/es200130u.
- [28] Z. F. Bhat, H. Bhat, and V. Pathak, “Prospects for In Vitro Cultured Meat – A Future Harvest,” in *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, 2014, pp. 1663–1683. doi: 10.1016/B978-0-12-398358-9.00079-3.
- [29] A. Pakseresht, S. Ahmadi Kaliji, and M. Canavari, “Review of factors affecting consumer acceptance of cultured meat,” *Appetite*, vol. 170, p. 105829, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.appet.2021.105829.
- [30] J. Lynch and R. Pierrehumbert, “Climate Impacts of Cultured Meat and Beef Cattle,” *Front Sustain Food Syst*, vol. 3, Feb. 2019, doi: 10.3389/fsufs.2019.00005.
- [31] H. Liao *et al.*, “Novel reactivation and degranulation of mast cells,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 127, p. 110157, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110157.
- [32] H. S. Kuehn, M. Radinger, and A. M. Gilfillan, “Measuring Mast Cell Mediator Release,” *Curr Protoc Immunol*, vol. 91, no. 1, Nov. 2010, doi: 10.1002/0471142735.im0738s91.
- [33] M. López-Pedrouso, J. Lorenzo, M. Gagaoua, and D. Franco, “Current Trends in Proteomic Advances for Food Allergen Analysis,” *Biology (Basel)*, vol. 9, no. 9, p. 247, Aug. 2020, doi: 10.3390/biology9090247.
- [34] E. Lima-Cabello, J. D. Alché, S. Morales-Santana, A. Clemente, and J. C. Jimenez-Lopez, “Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Seeds Gamma-Conglutin is an Anti-Inflammatory Protein Promoting Insulin Resistance Improvement and Oxidative Stress Amelioration in PANC-1 Pancreatic Cell-Line,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 1, p. 12, Dec. 2019, doi: 10.3390/antiox9010012.
- [35] J. A. Casal, E. Cano, and J. C. Tutor, “ β -Hexosaminidase isoenzyme profiles in serum, plasma, platelets and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes,” *Clin Biochem*, vol. 38, no. 10, pp. 938–942, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.05.016.
- [36] Y. Lv *et al.*, “Accurate quantification of β -hexosaminidase released from laboratory of allergic diseases 2 cells via liquid chromatography tandem mass spectrometry method,” *J Chromatogr A*, vol. 1578, pp. 106–111, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.09.059.



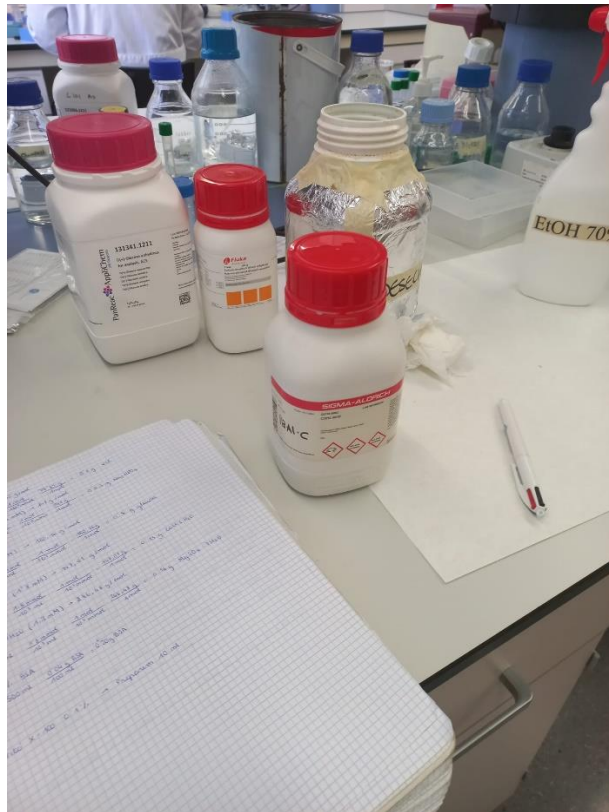
- [37] M. Bezerra, M. Ribeiro, and G. Igrejas, “An Updated Overview of Almond Allergens,” *Nutrients*, vol. 13, no. 8, p. 2578, Jul. 2021, doi: 10.3390/nu13082578.
- [38] I. Pali-Schöll *et al.*, “Edible insects: Cross-recognition of IgE from crustacean- and house dust mite allergic patients, and reduction of allergenicity by food processing,” *World Allergy Organization Journal*, vol. 12, no. 1, p. 100006, 2019, doi: 10.1016/j.waojou.2018.10.001.

10. Annexos

I. Imatges



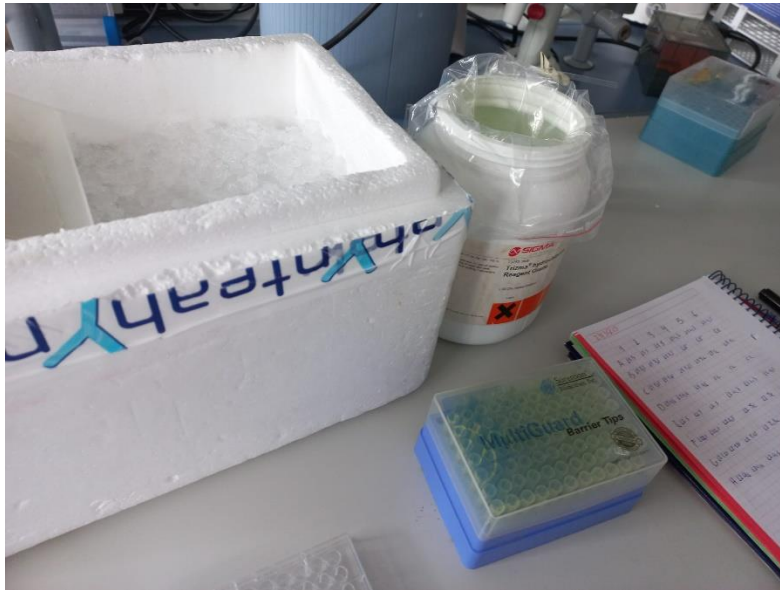
Imatge 1: Imatge dels extractes digerits. Font pròpia



Imatge 4: Preparació dels reagents per a la β -Hex



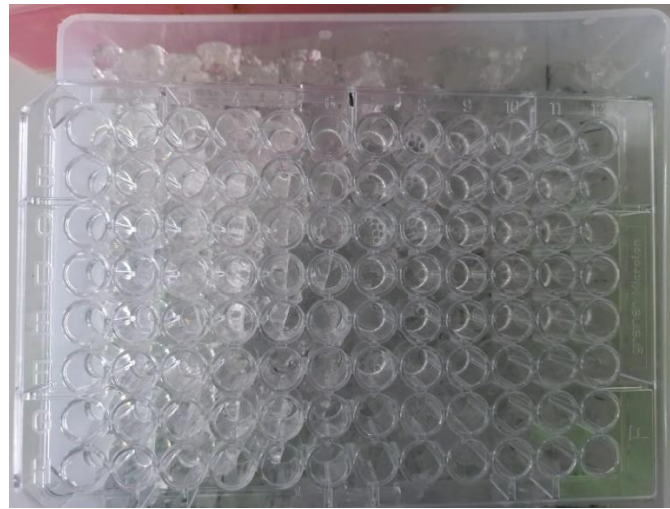
Imatge 5: Proveta on es va preparar el litre d'HEPES Buffer



Imatge 6: Espai de treball on planificar els pouets



Imatge 7: Plaqueta de 96 en gel



Imatge 8: Plaqueta de 96 amb els tractaments posats



Imatge 9: Plaqueta de 96 passades les hores d'incubació amb els reagents



Imatge 10: Cambra de flux laminar Telstar AV-100



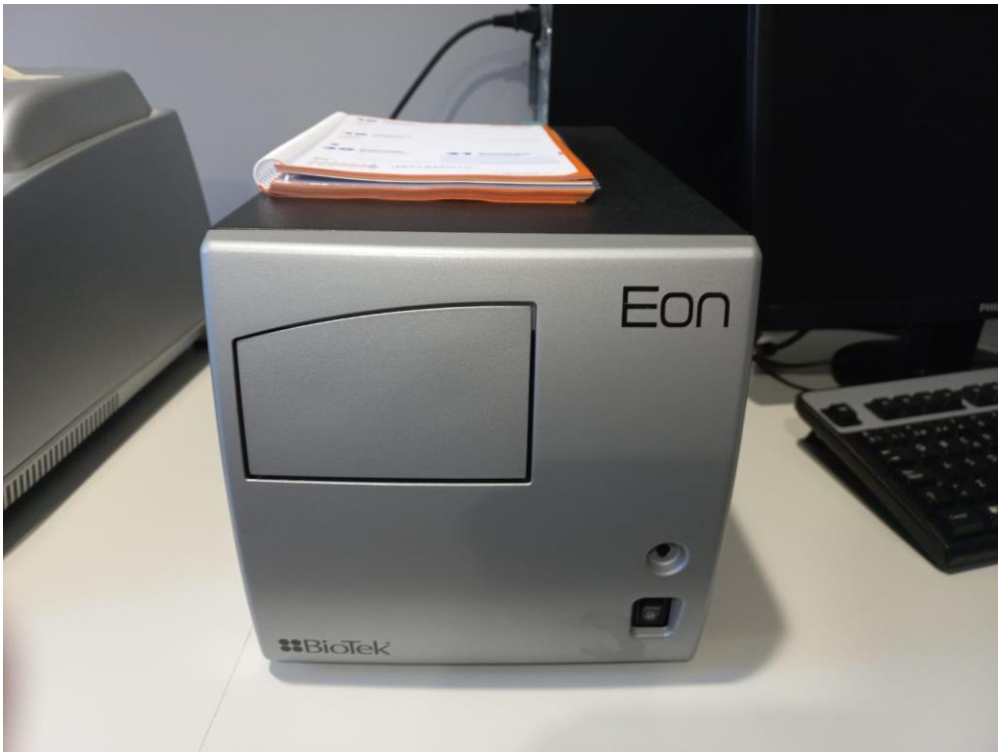
Imatge 11: Centrifuga refrigerada Heittek Mikro 200R



Imatge 12: Microscopi òptic Nikon



Imatge 13: Balança analítica Sartorius



Imatge 14: Lector de plaques BioTek Eon



II. Annex 2

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Àngel Ricard Escandell Faus

Nom i Cognoms del Tutor/a: Maria Teresa Blay Olivé

Data de la entrevista amb l'alumne: 24/05/2023

Recomanacions durant el seguiment: S'han fet diverses reunions de seguiment durant les que s'han fet modificacions i recomanacions sobre com millorar la memòria escrita.

Algunes de les recomanacions inclouen una millora en la redacció dels objectius i conclusions. Canvis en l'organització del treball i la seva estructura. Manera de presentar els resultats. Correccions de llenguatge entre altres.

Observacions: _____

Observacions Darrera revisió:

Un cop efectuades les darreres modificacions considero el treball apte per a la seva presentació.

Signatura del Tutor/a

Signatura del Alumne/a

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

Tarragona a 30 de Maig 2023



III. Taules

	mitjana	desv. Est.	n	error
Cel. Inici	88	13,986512	8	4,9449788
Hepes	100	0	6	0
C48/80 10	13	17,698257	8	6,2572788
C48/80 50	0	0	8	0
CE	69	32,032549	8	11,325216
L1 0,625	83	20,8663	8	7,3773513
L1 0,3	81	20,853562	8	7,3728474
L1 0,15	96	9,4491118	7	3,5714286
L1 0,07	78	24,989857	8	8,8352486
L2 0,625	70	20,321532	8	7,1847464
L2 0,3	73	26,472507	8	9,3594448
L2 0,15	86	16,711038	8	5,9082441
L2 0,07	88	20,412415	6	8,3333333
I 0,625	90	19,795582	8	6,9987952
I 0,3	85	13,287549	8	4,697858
I 0,15	80	24,070004	7	9,0976063
I 0,07	80	20,995795	8	7,4231346

Taula 7: Taula d'estadística feta per a la viabilitat

	1	2	3	Mitjana Bhex	Mitjana - Hepes	Desvest	Error
Hepes	17,89	17,11	19,36	18,12		1,14	0,66
C48/80 10	22,96	25,44	27,79	25,39	25,39	2,42	1,39
C48/80 50	29,84	36,28	45,51	37,21	37,21	7,88	4,55
CE	17,20	18,50	24,99	20,23	20,23	4,17	2,41
L1 0,6	18,82	17,79	26,72	21,11	21,11	4,89	2,82
L1 0,3	18,68	21,07	22,82	20,86	20,86	2,08	1,20
L1 0,15	16,97	24,15	22,64	21,25	21,25	3,78	2,18
L1 0,07	19,80	20,09	22,92	20,94	20,94	1,72	0,99
C1 0,6	24,13	19,59	20,31	21,34	21,34	2,44	1,41
C1 0,3	22,71	16,58	20,81	20,03	20,03	3,14	1,81
C2 0,6	28,36	19,31	22,16	23,28	23,28	4,63	2,67
C2 0,3	24,73	18,64	22,16	21,84	21,84	3,06	1,76
L2 0,6	23,43	19,85	19,91	21,06	21,06	2,05	1,18
L2 0,3	22,36	13,34	20,48	18,73	18,73	4,76	2,75
L2 0,15	23,31	23,12	21,22	22,55	22,55	1,16	0,67
L2 0,07	23,53	20,11	21,01	21,55	21,55	1,77	1,02

Taula 8: Exemple de taula amb els % de β -hex calculats, les seves mitjanes, errors i altres



Food item	Water footprint per ton (m ³ /ton)				Nutritional content			Water footprint per unit of nutritional value		
	Green	Blue	Grey	Total	Calorie (kcal/kg)	Protein (g/kg)	Fat (g/kg)	Calorie (liter/kcal)	Protein (liter/g protein)	Fat (liter/g fat)
Sugar crops	130	52	15	197	285	0.0	0.0	0.69	0.0	0.0
Vegetables	194	43	85	322	240	12	2.1	1.34	26	154
Starchy roots	327	16	43	387	827	13	1.7	0.47	31	226
Fruits	726	147	89	962	460	5.3	2.8	2.09	180	348
Cereals	1,232	228	184	1,644	3,208	80	15	0.51	21	112
Oil crops	2,023	220	121	2,364	2,908	146	209	0.81	16	11
Pulses	3,180	141	734	4,055	3,412	215	23	1.19	19	180
Nuts	7,016	1367	680	9,063	2,500	65	193	3.63	139	47
Milk	863	86	72	1,020	560	33	31	1.82	31	33
Eggs	2,592	244	429	3,265	1,425	111	100	2.29	29	33
Chicken meat	3,545	313	467	4,325	1,440	127	100	3.00	34	43
Butter	4,695	465	393	5,553	7,692	0.0	872	0.72	0.0	6.4
Pig meat	4,907	459	622	5,988	2,786	105	259	2.15	57	23
Sheep/goat meat	8,253	457	53	8,763	2,059	139	163	4.25	63	54
Beef	14,414	550	451	15,415	1,513	138	101	10.19	112	153

Taula 9: Consum d'aigua (litro) per tona i kcal de cada extracte alimentic, entre altres propietats[1].

Table 1: Batch-to-batch analysis of the NF forms (TM frozen and TM dried)

Parameter (unit)	Batch number (TM frozen)					Analytical method
	#1	#2	#3	#4	#5	
Crude protein (g/100 g of NF)	14.4	14.9	16.4	16.2	15.0	Kjeldahl (N × 6.25)
Fat (g/100 g of NF)	7.59	8.69	10.20	9.82	7.48	Gravimetric method
Digestible carbohydrates (g/100 g of NF)	1.34	1.32	1.39	1.56	1.32	Titrimetry-Luff School
Dietary fibre ^(a) (g/100 g of NF)	1.2	1.2	1.2	1.5	1.5	Enzymatic-gravimetry-AOAC. 2009.01 ^(b)
Sugars (g/100 g of NF)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	0.6	HPAEC-PAD ^(c)
Ash (g/100 g of NF)	1.02	0.99	1.04	1.10	0.97	Gravimetric method
Moisture (g/100 g of NF)	74.0	72.4	70.2	69.4	74.4	Gravimetric method
Energy value (kJ/100 g of NF)	560	610	690	680	570	Regulation (EU) 1169/2011 ^(d)
Parameter (unit)	Batch number (TM dried)					Analytical method
	#6	#7	#8	#9	#10	
Crude protein (g/100 g of NF)	54.5	54.3	56.6	56.6	55.9	Kjeldahl (N × 6.25)
Fat (g/100 g of NF)	28.7	28.4	28.4	28.6	28.9	Gravimetric method
Digestible carbohydrates (g/100 g of NF)	6.06	5.84	6.53	6.37	6.24	Titrimetry-Luff School
Dietary fibre ^(a) (g/100 g of NF)	4.4	4.6	5.1	5.0	4.7	Enzymatic-gravimetry- AOAC. 2009.01 ^(b)
Sugars (g/100 g of NF)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	< LOQ ^(c)	HPAEC-PAD ^(c)
Ash (g/100 g of NF)	3.68	3.77	4.02	4.09	3.76	Gravimetric method (500-550°C)
Moisture (g/100 g of NF)	3.13	3.16	0.66	0.58	1.77	Gravimetric method (102°C)
Energy value (kJ/100 g of NF)	2,100	2,100	2,200	2,200	2,200	Regulation (EU) 1169/2011

(a): Chitin is the main form of dietary fibre in the NF.

(b): AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

(c): Total sugars were calculated as the sum of individual sugars (excl. galactose), i.e. glucose, fructose, lactose, saccharose, maltose analysed by HPAEC-PAD (High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection). The LOQ for each individual sugar is < 0.1.

Taula 10: Especificacions del T. molitor com a Novel Food, font: EFSA Journal [18]

Insecte	1	2	3	4	5	6
A	15	15	15	10,32	10,32	10,32
B	12'5	12'5	12'5	10,16	10,16	10,16
C	11,25	11,25	11,25	10,07	10,07	10,07



D	I 0,625	I 0,625	I 0,625	Control C	Control C	Control C
	Digerits			Control		
L1	1	2	3	4	5	6
A	L1 5	L1 5	L1 5	L1 0,32	L1 0,32	L1 0,32
B	L1 2'5	L1 2'5	L1 2'5	L1 0,16	L1 0,16	L1 0,16
C	L1 1,25	L1 1,25	L1 1,25	Control E	Control E	Control E
D	L1 0,625	L1 0,625	L1 0,625	Control C	Control C	Control C
	Digerits			Control		
L2	1	2	3	4	5	6
A	L2 5	L2 5	L2 5	L2 0,32	L2 0,32	L2 0,32
B	L2 2'5	L2 2'5	L2 2'5	L2 0,16	L2 0,16	L2 0,16
C	L2 1,25	L2 1,25	L2 1,25	L2 0,07	L2 0,07	L2 0,07
D	L2 0,625	L2 0,625	L2 0,625	Control C	Control C	Control C
	Digerits			Control		

Taula 11: Exemple de planificació de pouets amb extractes d'Insecte i tramús(Lupin).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hepes	hepes	hepes	0,63	0,63	0,63	hepes	hepes	hepes	0,63	0,63	0,63
B	c48/80 10	c48/80 10	c48/80 10	0,31	0,31	0,31	c48/80 10	c48/80 10	c48/80 10	0,31	0,31	0,31
C	c48/80 50	c48/80 50	c48/80 50	0,16	0,16	0,16	c48/80 50	c48/80 50	c48/80 50	0,16	0,16	0,16
D	CE 0'6	CE 0'6	CE 0'6	0,07	0,08	0,09	CE 0'6	CE 0'6	CE 0'6	0,07	0,08	0,09
E	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
F	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
G	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
H	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07

Taula 12: Planificació de pouets per a la B-hex. Del 1 al 6, sobrenedant, del 7 al 12, lisat amb Tritó.

	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	n. Cèl. vives	cèl. Mortes	cèl. Mortes	cèl. Mortes	cèl. Mortes	cèl. Mortes	cèl. Mortes	cèl. Mortes
Cèl. Inici	2	4	4	3	3	7	2	6	0	0	0	0	0	1	1	1
Hepes	3	1	6	3	8	5	5	1	0	0	1	1	0	0	0	0
C48/80 10	0	2	1	0	0	1	0	1	6	2	8	8	7	6	2	3
C48/80 50	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	2	4	8	3	3
CE	4	4	4	6	4	0	3	3	0	1	3	0	1	1	2	1
L1 0,625	7	2	3	2	3	2	6	2	0	1	0	0	2	0	1	2
L1 0,3	3	3	3	2	3	3	5	7	0	0	2	1	2	0	0	5
L1 0,15	8	3	3	2	5	7	5	5	0	1	0	0	0	0	2	0
L1 0,07	2	4	3	2	7	2	5	2	0	1	0	0	2	3	1	3
L2 0,625	4	3	5	2	1	3	2	4	3	2	2	2	1	1	0	0
L2 0,3	1	7	4	5	6	2	2	3	0	0	1	0	3	4	2	3
L2 0,15	5	7	6	7	5	6	6	3	0	0	1	0	0	3	2	2
L2 0,07	7	4	1	4	8	3	6	1	0	0	1	1	0	0	3	1
I 0,625	1	1	3	1	1	1	3	2	0	0	0	1	0	0	0	1
I 0,3	3	4	3	3	3	6	6	6	0	1	0	0	1	2	1	3
I 0,15	4	4	4	1	7	0	1	6	1	0	1	0	3	0	2	0
I 0,07	6	5	3	3	5	2	2	6	0	1	0	0	2	3	1	2


Taula 13: Recompte de cèl·lules vives/mortes a cada quadre de la cambra de Neubauer a l'assaig de Trypan Blue



Pouets	Del 1 al 6			Del 7 al 12		
	SN1	SN2	SN3	Lisat1	Lisat2	Lisat3
Hepes	0,094	0,094	0,107	0,251	0,263	0,263
C48/80 10	0,113	0,119	0,129	0,232	0,219	0,216
C48/80 50	0,158	0,15	0,19	0,245	0,188	0,185
CE	0,092	0,102	0,105	0,256	0,263	0,197
L1 0,6	0,096	0,102	0,126	0,243	0,274	0,22
L1 0,3	0,098	0,101	0,106	0,25	0,227	0,219
L1 0,15	0,095	0,11	0,096	0,268	0,214	0,2
L1 0,07	0,095	0,099	0,106	0,228	0,234	0,218
C1 0,6	0,114	0,096	0,11	0,222	0,233	0,257
C1 0,3	0,104	0,092	0,108	0,216	0,266	0,246
C2 0,6	0,116	0,097	0,107	0,19	0,239	0,228
C2 0,3	0,107	0,095	0,114	0,203	0,243	0,243
L2 0,6	0,106	0,099	0,106	0,213	0,237	0,253
L2 0,3	0,108	0,098	0,101	0,228	0,355	0,234
L2 0,15	0,101	0,105	0,108	0,204	0,214	0,241
L2 0,07	0,108	0,108	0,114	0,216	0,255	0,257

Taula 14: Exemple de taula que ens queda de β -hex d'un experiment determinat

IV. PNT realitzat

 UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI	Procediment Normalitzat de Treball
	Mesura de la desgranulació de mastòcits amb alliberament de B-hexosaminidasa i Histamina. Recompte amb <i>Trypan blue</i> .
	25/4/2023

Material:

- Cèlules mastòcites humanes (KU812)
- IgE humana
- HEPES Buffer, pH = 7,4
- PNAG
- Citrat Buffer 40mM, pH = 4,5
- Glicina 400mM pH= 10,7
- Tritó X-100 0,1%
- Centrifuga refrigerada
- Plaques 96 pouets
- Espectrofotòmetre amb *plate Reader*
- Plaques 24 pouets



- Kit ELISA Histamina
- Xeringa
- Filtres de xeringa

Totes les incubacions en un ambient a 37°C, 5% CO₂ i humitat si no s'especifica el contrari.

Totes les solucions i equip que hagi d'entrar en contacte amb les cèl·lules ha d'estar esterilitzat i s'ha de treballar sempre amb tècniques asèptiques amb aquestes ultimes.

Totes les solucions fetes amb aigua destil·lada. Medi i solucions s'han de filtrar i mantenir a 4°C.

Preparació de cèl·lules:

Al utilitzar cèl·lules no adherents, per a substituir el medi o rentar les cèl·lules primer haurem de centrifugar les cèl·lules 5 minuts a 450 x g a temperatura ambient i llevar el sobrenedant amb cura.

1. Posar medi adequat (RPMI 1640 en cas de les KU812) amb FBS per a afavorir el creixement de les cèl·lules o sense FBS per a manteniment.
2. Quan les cèl·lules estiguin en la concentració adequada per a utilitzar-se, un dia abans les deixarem *overnight* amb l'IgE humana a una concentració de 100ng/mL per a sensibilitzar-les.
3. Després de la sensibilització, rentarem les cèl·lules 3 vegades amb 10ml d'HEPES buffer (pH = 7,4, 37°C) per a eliminar l'excés d'IgE.

Assaig B-Hex

4. Re-suspenem cèl·lules en HEPES buffer i les aliquotem a la placa de 96 pouets (per a referència, unes 5000-10000cèls/pou). Volum final per pou = 100uL. Posarem 10uL d'agonista, per tant calculem per a posar 90ul/pou a 96 pous.
5. Incubem les cèl·lules a 37°C durant 5-10 minuts.
6. Preparem els *stocks* d'agonista en HEPES buffer. En el nostre cas, preparàvem els extractes de proteïna en diferents concentracions. Haurem de posar 10uL dels agonistes preparats i desitjats a cada pouet. És recomanable tenir les mostres almenys en duplicat i per a corregir l'error de fluorescència, preparar una mostra en blanc que només contingui HEPES buffer.
7. Incubar a 37°C durant 4h sense CO₂.
8. Durant incubació, preparem el PNAG amb el Citrat Buffer. Calculem el volum total que necessitarem; més o menys 10ml per a una placa de 96. Dissolem 35mg de PNAG per 10ml de citrat buffer.

El PNAG es difícil de dissoldre; tenir en compte posar-ho en un recipient on es pugui barrejar bé amb un imant i plantejar barrejar-ho amb la solució a una temperatura més elevada.



9. Aliquotem 100ul/pou de solució PNAG a una nova placa de 96 (Multicanal).
10. Després de la incubació del pas 7, centrifuguem la placa 5min a 450 x g, 4°C per a parar la reacció i assegurar-nos de que les cèl·lules es trobin a la base de la placa.
11. Llevem amb cura 50uL dels sobrenedants de la placa original i les afegim a la placa de 96 amb PNAG. Incubem 90 minuts, 37°C i sense CO2.
12. Posem 150uL/pou de 0,1 Tritó X-100 als 50uL restants de la placa original. Ho re-suspenem amb compte, agafem 50uL de cada lisat i el posem a la solució de PNAG. Incubem la placa durant 90 minuts a 37°C (sense CO2).
13. Després de l'incubació, posem 50ul de Glicina 400mM a cada pou. Si apareix color grogós = Activitat B-hex.
14. Llegim l'absorbància a 405nm. *Reference filter* a 620nm.
15. Calculem percentatge de B-hex.

$$\% \text{ alliberat} = 100 * (2 * \text{sobrenedant}) / ((1/2 * \text{sobrenedant}) + (4 * \text{lisat}))$$

Assaig Histamina

1. Preparem tots els re-agents que ens indica el kit.
2. Treballem amb una densitat d'entre **10.000-20.000** cèl·lules, posarem en cada pou d'una placa de 24 pouets 450ul de la concentració esmentada de cèl·lules i hi afegirem 50uL del tractament. Ho deixarem incubar 2h.
3. Centrifugarem 5 minuts a 1500 x g. Descartem el medi un cop centrifugat i ho tindrem preparat per a congelar a -80°C. Tindrem així les cèl·lules tractades i llestes per a començar amb el procediment del kit específic.

Kit Histamina (per a més detall mirar el manual corresponent)

4. Afegim 50uL de *Biot. Detection Ab* a cada pouet, ho incubem durant 45min a 37°C.
5. Rentem 3 vegades (300ul/pou)
6. Afegim 100uL HRP conjugat i incubem 15min a 37°C.
7. Rentem 5 vegades com indicat al pas 5.
8. Afegim 90uL de substrat i ho incubem 15min a 37°C.
9. Afegim 50uL de *STOP solution* i llegim a 450nm.

Assaig Trypan Blue

1. Treballem amb una densitat d'entre **10.000-20.000** cèl·lules com en la histamina, posarem en cada pou d'una placa de 24 pouets 450ul de la concentració esmentada de cèl·lules i hi afegirem 50uL del tractament. Ho deixarem incubar 4h.
2. Passarem 1ml de cada tractament a *eppendorfs* d'1,5ml. Ens assurem de fer molt d'*up and down* per a re-suspendre-ho bé i agafar cèl·lules. Passarem a treballar a la campana.
3. Dins de la campana, filtrarem amb una xeringa i filtres 1ml de *Trypan Blue* en un *eppendorf* d'1,5ml.



4. Prepararem nous *eppendorfs* on posarem 15uL de cèl·lules tractades i 15uL de *Trypan Blue*. Així tindrem preparada la solució per a posar-la a la cambra de *Neubauer* i fer el recompte de cèl·lules vives/cèl·lules mortes.

V. Reactius de la β -hexosaminidasa

HEPES Buffer (pH = 7,4)

- Hepes 10nM
- NaCl 137nM
- KCl 2'7nM
- Na₂HPO₄ 0,4nM
- Glucosa 5,6nM
- CaCl₂ · H₂O 1,8nM
- MgSO₄ · 7H₂O 1,3nM
- BSA 0,04nM (0,4%)

Citrat Buffer (pH = 4,5)

- Àcid Cítric 40nM
- Na₂HPO₄ 20nM
- PNAG (segons volum)

Glicina (pH = 10,7)

- Glicina 400nM

Tritó-X-100, 1:1000ml

Cada reactiu ha sigut ajustat al seu pH corresponent amb el pH-metre.

VI. Mètodes estadístics aplicats

Aplicarem un T test per a les mostres de la viabilitat (Taula 15)(Taula 16).

	L1 0,625	L1 0,3	L1 0,15	L1 0,07	L2 0,625	L2 0,3	L2 0,15	L2 0,07	I 0,625	I 0,3	I 0,15	I 0,07
vs HEPES	0,151903544	0,09606573	0,75196632	0,0862376	0,007752116	0,03947484	0,19917909	0,12233279	0,49008914	0,11247961	0,13641154	0,07744041
vs c48/80	4,14726E-06	5,86789E-06	4,74046E-08	3,18845E-05	2,85342E-05	0,000107212	6,47643E-07	9,62482E-06	1,01816E-06	2,28512E-07	2,81013E-05	7,30637E-06

Taula 15: T-test de tramús 1 (L1), tramús 2(L2) i Insecte (I) per a la viabilitat cel·lular.

	A 0,625	A 0,3	A 0,15	A 0,07	S 0,625	S 0,3	S 0,15	S 0,07
vs Hepes	2,14174E-05	0,017916	0,003768	0,334281943	0,334281943			0,067545375
vs C48/80	0,000825302	0,0002764	0,0003354	1,16946E-06	6,74169E-07	5,45521E-07	5,45521E-07	1,36894E-06

Taula 16: T-test d'ametlla (A) i Soja (S) per a la viabilitat cel·lular.



Per a la β -hex, quan es tinguin totes les dades dels experiments extretes, hauran de ser ajuntades per a aplicar mètodes estadístics amb totes les dades conjuntes.

El primer que es farà serà posar tots els percentatges de β -hex calculats de cada mostra i passar un test de valors atípics per a cada tractament (Taula 17).

L1 0,6	L1 0,3	L1 0,15	L1 0,07	L2 0,6	L2 0,3	L2 0,15	L2 0,07	I 0,6	I 0,3	I 0,15	I 0,07
18,82	18,68	16,97	19,80	23,43	22,36	23,31	23,53	22,99	31,03	28,91	28,47
17,79	21,07	24,15	20,09	19,85	13,34	23,12	20,11	27,51	24,70	23,71	32,02
26,72	22,82	22,64	22,92	19,91	20,48	21,22	21,01	22,81	25,39	27,41	34,40
22,02	32,11	28,52	30,89	24,48	21,15	20,14	24,69	14,47	12,97	13,13	13,18
22,74	29,06	28,02	31,20	26,67	22,56	22,82	24,29	11,07	13,49	13,37	14,27
23,30	25,63	26,88	31,99	23,94	26,18	26,84	26,67	11,74	12,42	13,16	9,71
12,12	14,49	20,95	17,90	13,23	15,65	14,86	18,11	8,79	7,87	8,78	7,41
17,62	15,84	12,26	15,79	16,22	14,48	16,35	17,65	6,20	7,26	7,46	10,14
13,42	14,98	12,66	13,91	12,34	13,97	14,60	17,27	12,23	16,15	11,87	15,61

Taula 17: Dades experimentals ajuntades, amb valors que difereixen de la resta però no acaben de ser valors atípics marcats en groc clar.

Esbrinarem els valors atípics utilitzant l'eina de *GraphPad* (<https://www.graphpad.com>), aplicant un nivell de significança de $\alpha=0,05$. Al final no queda cap valor atípic significatiu, només nombres més allunyats de la resta que no s'acaben de considerar valors atípics i estan marcats a la taula per a cada tractament.

Acabat això, haurem de calcular i aplicar el factor de correcció per a cada experiment. El control que utilitzarem per a calcular aquest factor de correcció serà l'HEPES, que tal com hem mencionat abans ha sigut el comprovat i utilitzat en tots els experiments.

Es farà una mitjana de totes les mostres d'HEPES i es restarà cada mostra d'HEPES amb la mitjana. D'aquests valors es farà una mitjana de cada valor per grup d'experiment(Taula 18).

Factor de correcció		
Hepes -Mitjana Hepes	Experiment	
2,59	3,11	
3,37		
3,37		1
2,75	-1,34	
-4,83		
-1,94		2
8,76	5,6569461	
2,53		
5,68		3
12,59	13,2301027	
13,31		
13,79		4
-17,36	-20,65	
-20,08		
-24,53		5

Taula 18: Càlcul del factor de correcció per a cada experiment.



El següent que haurem de fer serà restar cada tant per cent de β -hex de cada tractament per al seu respectiu experiment la mitjana d'HEPES de correcció que ens ha quedat a la taula anterior.

Ens quedaria una taula (Taula 19) amb valors que, com podem observar es corresponen molt bé entre ells un cop hem aplicat el factor de correcció per a cadascun.

Aplicant Factor Correcció		L1 0,6	L1 0,3	L1 0,15	L1 0,07	L2 0,6	L2 0,3	L2 0,15	L2 0,07	I 0,6	I 0,3	I 0,15	I 0,07
Exp	1	21,93	21,79	20,08	22,91	26,53	25,47	26,42	26,64	-	-	-	-
		20,89	24,18	27,26	23,20	22,96	16,45	26,22	23,22	-	-	-	-
		29,83	25,93	25,75	26,02	23,01	23,58	24,32	24,12	-	-	-	-
		20,68	30,77	27,18	29,55	23,14	19,81	18,80	23,35	21,65	29,69	27,57	27,13
	2	21,40	27,72	26,68	29,86	25,33	21,22	21,48	22,95	26,17	23,36	22,37	30,68
		21,96	24,29	25,54	30,65	22,60	24,84	25,50	25,33	21,47	24,05	26,07	33,06
		17,78	20,15	26,60	23,55	18,88	21,31	20,51	23,76	20,13	18,63	18,79	18,83
		23,28	21,50	17,92	21,44	21,88	20,14	22,00	23,31	16,72	19,15	19,03	19,93
	3	19,07	20,64	18,32	19,57	18,00	19,63	20,26	22,93	17,39	18,08	18,81	15,36
		-	-	-	-	-	-	-	-	22,02	21,10	22,01	20,64
		-	-	-	-	-	-	-	-	19,43	20,49	20,69	23,37
		-	-	-	-	-	-	-	-	25,46	29,38	25,10	28,84
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Taula 19: Taula amb les dades experimentals amb el seu factor de correcció corresponent de cada experiment sumat

Tornaríem a fer un test de valors atípics per als valors; aquest cop si que tindríem una de les dades del L1 0'6 que hauríem de treure.

Finalment, ens quedaria la següent taula amb els tractaments i els controls passats pel factor de correcció i per un test de valors atípics (Taula 20):

C48/80 10	C48/80 50	CE 0,6	L1 0,6	L1 0,3	L1 0,15	L1 0,07	L2 0,6	L2 0,3	L2 0,15	L2 0,07	I 0,6	I 0,3	I 0,15	I 0,07
26,06	32,95	20,30	21,93	21,79	20,08	22,91	26,53	25,47	26,42	26,64	21,65	29,69	27,57	27,13
28,55	39,38	21,60	20,89	24,18	27,26	23,20	22,96	16,45	26,22	23,22	26,17	23,36	22,37	30,68
30,89	48,61	28,09	20,68	25,93	25,75	26,02	23,01	23,58	24,32	24,12	21,47	24,05	26,07	33,06
28,96	32,43	24,69	21,40	30,77	27,18	29,55	23,14	19,81	18,80	23,35	20,13	18,63	18,79	18,83
30,87	29,67	24,48	21,96	27,72	26,68	29,86	25,33	21,22	21,48	22,95	16,72	19,15	19,03	19,93
26,86	30,21	22,19	17,78	24,29	25,54	30,65	22,60	24,84	25,50	25,33	17,39	18,08	18,81	15,36
51,55	65,37	19,08	23,28	20,15	26,60	23,55	18,88	21,31	20,51	23,76	22,02	21,10	22,01	20,64
50,98	66,48	22,77	19,07	21,50	17,92	21,44	21,88	20,14	22,00	23,31	19,43	20,49	20,69	23,37
53,68	54,52	20,82		20,64	18,32	19,57	18,00	19,63	20,26	22,93	25,46	29,38	25,10	28,84
	44,27	21,50												
	40,37	20,06												
	42,70	22,39												
	28,93	16,60												
	30,47	21,22												
	29,01													

Taula 20: Taula amb valors experimentals passats per test de valors atípics i factor de correcció.

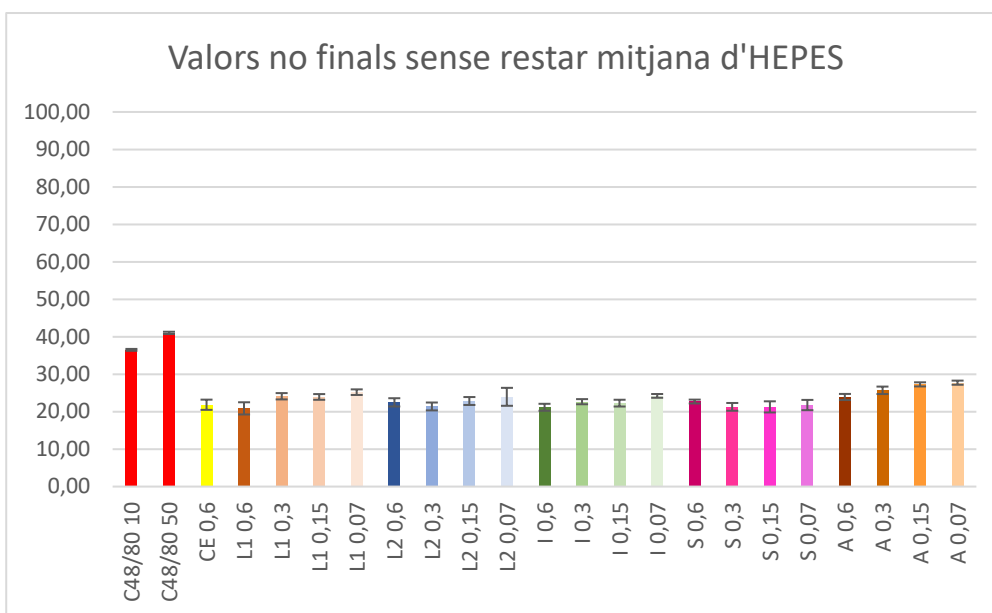


Figura 10: Valors de tots els experiments passats pels respectius factors de correcció representats gràficament. Gràfic en brut ja que encara queda restar HEPES i passar-ho per programes estadístics.

Ens faltaria restar la mitjana de tots els HEPES calculada prèviament a tots els valors i tindriem la taula final a partir de la qual extrauríem diferents estadístiques i conclusions (Taula 21 Taula 21).

C48/80 10	C48/80 50	CE 0,6	L1 0,6	L1 0,3	L1 0,15	L1 0,07	L2 0,6	L2 0,3	L2 0,15	L2 0,07	I 0,6	I 0,3	I 0,15	I 0,07
5,59	12,47	-0,17	1,46	1,32	-0,40	2,44	6,06	4,99	5,95	6,16	1,18	9,22	7,10	6,66
8,07	18,91	1,13	0,42	3,71	6,78	2,72	2,48	-4,02	5,75	2,74	5,70	2,89	1,89	10,21
10,42	28,14	7,62	0,21	5,45	5,27	5,55	2,54	3,11	3,85	3,65	1,00	3,57	5,60	12,58
8,49	11,96	4,22	0,92	10,30	6,71	9,08	2,67	-0,66	-1,67	2,88	-0,35	-1,84	-1,68	-1,64
10,40	9,20	4,01	1,49	7,25	6,21	9,39	4,85	0,75	1,01	2,48	-3,75	-1,32	-1,44	-0,54
6,39	9,74	1,72	-2,69	3,81	5,07	10,18	2,12	4,37	5,03	4,85	-3,08	-2,39	-1,66	-5,11
31,07	44,90	-1,39	2,81	-0,32	6,13	3,08	-1,59	0,84	0,04	3,29	1,55	0,63	1,54	0,17
30,50	46,01	2,30	-1,40	1,03	-2,56	0,97	1,40	-0,33	1,53	2,84	-1,04	0,02	0,22	2,90
33,20	34,05	0,35		0,17	-2,16	-0,90	-2,48	-0,84	-0,22	2,46	4,99	8,91	4,63	8,37
	23,80	1,03												
	19,90	-0,41												
	22,23	1,92												
	8,45	-3,88												
	9,99	0,74												
	8,53													

Taula 21: Taula anterior amb correcció i mitjana d'HEPES restada per a cada valor

Ara es farà un test de T de Student respecte al control d'enzims i els dos controls positius C48/80, el qual ens servirà per a veure si hi ha diferència entre les mitjanes de les mostres.

Les que mostrin una diferència significativa amb les del control positiu C48/80 ($p < 0,05$), s'interpretaran com a tractaments que poden ser potencialment al·lergènics i al mateix temps, les que no mostrin diferència significativa respecte al control d'enzims ($p > 0,05$), ens permetran afirmar la nostra hipòtesi sobre la baixa al·lergicitat de les fonts proteïques (Taula 22).



		C48/80 10	C48/80 50	CE 0,6	L1 0,6	L1 0,3	L1 0,15	L1 0,07	L2 0,6	L2 0,3	L2 0,15	L2 0,07	I 0,6	I 0,3	I 0,15	I 0,07
T student	vs CE	0,00019	0,00001	0,48756	0,38066	0,09930	0,14913	0,02633	0,59083	0,70343	0,41236	0,04254	0,59131	0,58688	0,73864	0,21139
	vs c50	0,39625	1,00000	0,00001	0,00025	0,00086	0,00082	0,00165	0,00032	0,00017	0,00039	0,00066	0,00016	0,00043	0,00030	0,00129
	vs c10	1,00000	0,39625	0,00019	0,00218	0,00828	0,00803	0,01528	0,00317	0,00183	0,00389	0,00600	0,00172	0,00458	0,00311	0,01338
		S 0,6	S 0,3	S 0,15	S 0,07	A 0,6	A 0,3	A 0,15	A 0,07	V 0,6	V 0,3	V 0,15	V 0,07			
T student	vs CE	0,61454	0,66496	0,66821	0,95133	0,14894	0,00836	0,00349	0,00181	0,25342	0,63113	0,97042	0,38141			
	vs c50	0,00317	0,00150	0,00327	0,00395	0,00473	0,00969	0,01996	0,02378	0,01241	0,02748	0,02171	0,01457			
	vs c10	0,01859	0,00882	0,01554	0,01844	0,02542	0,04817	0,09394	0,10935	0,03978	0,07889	0,06396	0,04522			

Taula 22: Valors experimentals sotmesos a T-student respecte al control d'enzims (CE) i els controls positius C48/80 A 10 i a 50µg/ml, respectivament.

Haurem de comprovar que els resultats donats són fiables o si bé la falta de mostres pot anul·lar la credibilitat del test de T de Student. Utilitzarem l'eina XLSTAT per a fer tests de normalitat on ens sortirà com a valors no paramètrics; per tant haurem de buscar un altre mètode de comparació de mitjanes. El triat ha sigut el test de *Kruskal-Wallis*, el qual ha generat una taula de comparació entre *p-values* de cada experiment inserint la taula amb el factor de correcció i la mitjana d'HEPES restada mostrada anteriorment al programa.

Aquest ens ha donat diverses estadístiques de l'experiment, entre les quals ens quedarem amb el test estadístic que ens indica una aproximació de la possible hipòtesi; nul·la o hipotètica. Té en consideració la correcció de *Bonferroni*, la qual ajusta els valors dividint el nivell de significança amb el nombre de tests (Taula 23).

	C48/80 10	C48/80 50	CE 0,6
C48/80 10	1	0,657	<0,0001
C48/80 50	0,657	1	<0,0001
CE 0,6	<0,0001	<0,0001	1
L1 0,6	<0,0001	<0,0001	0,544
L1 0,3	0,008	0,001	0,209
L1 0,15	0,010	0,001	0,186
L1 0,07	0,031	0,004	0,072
L2 0,6	0,001	<0,0001	0,631
L2 0,3	<0,0001	<0,0001	0,756
L2 0,15	0,001	<0,0001	0,538
L2 0,07	0,015	0,002	0,131
I 0,6	<0,0001	<0,0001	0,707
I 0,3	0,000	<0,0001	0,785
I 0,15	0,000	<0,0001	0,821
I 0,07	0,005	0,000	0,271
S 0,6	0,001	<0,0001	0,858
S 0,3	0,000	<0,0001	0,767
S 0,15	0,000	<0,0001	0,734
S 0,07	0,001	<0,0001	0,928
A 0,6	0,018	0,003	0,269
A 0,3	0,145	0,048	0,037
A 0,15	0,278	0,116	0,013
A 0,07	0,335	0,150	0,009

Taula 23: Taula estadística comparativa de cada experiment feta amb XLSTAT.